

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACIÓN DE GENES VINCULADOS CON LA CONDICIÓN DE  
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium  
tuberculosis***

**Por**

**Q.B.P. LAURA ADIENE GONZÁLEZ ESCALANTE**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología**

**Septiembre, 2011**

**IDENTIFICACIÓN DE GENES VINCULADOS CON LA CONDICIÓN DE  
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium  
tuberculosis***

**Comité de tesis**

---

**Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León**

Presidente

---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**

Secretario

---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**

Primer vocal

**IDENTIFICACIÓN DE GENES VINCULADOS CON LA CONDICIÓN DE  
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium  
tuberculosis***

**por**

**Q.B.P. LAURA ADIENE GONZÁLEZ ESCALANTE**

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León, y del Dr. Salvador Luis Said y Fernández del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

---

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director Interno

---

Dr. Salvador Luis Said y Fernández

Director Externo

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	vii
DEDICATORIA .....	viii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
NOMENCLATURA .....	xiii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. HIPÓTESIS .....	5
3. OBJETIVOS .....	6
3.1. Objetivo General .....	6
3.2. Objetivos Particulares .....	6
4. ANTECEDENTES .....	7
4.1. Tuberculosis Como Problema de Salud Mundial .....	7
4.2. Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a Fármacos .....	7
4.3. Mecanismos de Resistencia a Fármacos de Primera Línea .....	8
4.4. Identificación de la Condición de Resistencia a Fármacos en <i>M. tuberculosis</i> .....	9
4.5. Relación de la Expresión Génica de <i>M. tuberculosis</i> con el Efecto Producido por Fármacos .....	11
5. MÉTODOS .....	12
5.1. Selección de Cepas de <i>M. Tuberculosis</i> .....	12
5.2. Cultivo de Cepas .....	12
5.3. Extracción de Ácidos Nucléicos de Cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	13
5.3.1. Extracción de DNA genómico .....	13
5.3.1.1. Extracción a partir de medio líquido Middlebrook 7H9 .....	13
5.3.1.2. Extracción a partir de medio sólido Lowenstein- Jensen .....	14
5.3.2. Extracción de RNA total .....	15

Sección	Página
5.4. Ensayos de PCR .....	16
5.5. Purificación de los Productos de PCR .....	27
5.6. Marcaje, Precipitación y Secuenciación de los Productos de PCR .....	28
5.7. Análisis de las Secuencias .....	29
5.8. Análisis de Expresión Usando Microarreglos .....	29
5.9. Análisis Estadístico de la Expresión Diferencial .....	30
 6. RESULTADOS .....	 32
6.1. Selección de Cepas para el Estudio .....	32
6.2. Establecimiento de las Condiciones para la Identificación de Mutaciones en Cepas de <i>M. tuberculosis</i> con Diferentes Perfiles de Resistencia y Sensibilidad a Fármacos de Primera Línea .....	34
6.3. Identificación de Mutaciones en los Genes <i>rrs</i> y <i>rpsL</i> que Confieren Resistencia a Estreptomina .....	34
6.4. Identificación de Mutaciones en los Genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> que Confieren Resistencia a Isoniazida .....	40
6.5. Identificación de Mutaciones en el gen <i>embB</i> que Confiere Resistencia a Etambutol .....	45
6.6. Identificación de Mutaciones en el gen <i>rpoB</i> que Confieren Resistencia a Rifampicina .....	47
6.7. Identificación de Mutaciones en el gen <i>pncA</i> que Confieren Resistencia a Pirazinamida .....	48
6.8. Mutaciones en los Genes no Condicionan a un Fenotipo de Resistencia a Fármacos de Primera Línea .....	51
6.9. Análisis de los Perfiles de Expresión Genética en Cepas Pansensible y Panresistente a Fármacos de Primera Línea ....	51
6.10. Análisis Exploratorio de Calidad de Datos .....	53
6.11. Preprocesamiento de Datos .....	56
6.12. Visualización de la Intensidad de Señal de los Microarreglos .....	57
6.13. Expresión Diferencial de Genes Entre Cepas H37Rv y CIBIN99 .....	58
 7. DISCUSIÓN .....	 60
7.1. Expresión Génica Diferencial en <i>M. tuberculosis</i> .....	66
 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	 69
8.1. Conclusiones .....	69
8.2. Recomendaciones .....	70

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
APÉNDICE I. Análisis de los Perfiles de Expresión de Cepas de <i>M. tuberculosis</i> Expuestas a Dimetilsulfóxido .....	71
LITERATURA CITADA .....	80
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	85

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo otorgado para la obtención del grado de Maestría en Ciencias, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y al capital humano de la misma dónde me he formado académicamente como profesionista. Al Doctor Mario A. Bermúdez de León por su guía ejemplar de trabajo y compromiso, por contar con la fortuna de caminar bajo su tutela desde mi primer contacto con la ciencia hasta el día de hoy y a quien le debo innumerables lecciones de humanismo e integridad. Gracias al Dr. Salvador Said por acogerme como parte del equipo de investigación en tuberculosis, por apoyarme y compartir conmigo su invaluable experiencia; a la Dra. Licet Villarreal por la dedicación y compromiso manifestados constantemente durante el desarrollo de este proyecto; al Dr. Pablo Zapata por su interés y gran disposición en este proceso. Al Centro de Investigación Biomédicas del Noreste del IMSS, institución que cobijó el desarrolló este trabajo. Agradezco a la M. en C. Katia Peñuelas excelente compañera y amiga, por el enorme apoyo, por su paciencia y por compartir sus conocimientos generosamente. Al Lic. José Dávila, por su importante participación en el análisis de la expresión diferencial. A mis estimados compañeros del laboratorio de Biología Molecular, en especial a Carolina Becerril y Erik Blancas por su amistad y por el aprendizaje compartido en el crecimiento constante. A la Dra. Gloria Molina y el Dr. Víctor Torres así como al equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y la Biología Molecular de las Micobacterias. Agradezco a todos los compañeros e investigadores que compartieron conmigo el desarrollo de esta tesis enriqueciéndola y enriqueciéndome, a Fernando Méndez gracias por sus valiosas aportaciones. A mis amigos por creer en mí y tener siempre palabras de aliento. A toda mi familia, a mis Padres, a mis hermanos José Alejandro y Erick Paúl por caminar conmigo para ayudarme a alcanzar ésta y todas las metas que tengo la fortuna de compartir con ellos, en todo lo que hago y todo lo que soy agradezco la bendición de tenerlos.

## DEDICATORIA

*....A Martha Eneida y José Alfredo,  
el brillante faro que en el océano de la vida  
me guía siempre de regreso a casa, a tierra firme,  
donde apaciblemente soy....*

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos génicos en <i>M. tuberculosis</i> .....	17
2.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>rpsL</i> .....	18
3.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>rrs</i> (fragmento <i>rrs1</i> ) .....	19
4.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>rrs</i> (fragmento <i>rrs2</i> ) .....	20
5.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>katG</i> .....	21
6.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>inhA</i> .....	22
7.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>embB</i> .....	23
8.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>rpoB</i> .....	24
9.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>pncA</i> (fragmento <i>pncA1</i> ) .....	25
10.	Condiciones de amplificación por PCR para gen <i>pncA</i> (fragmento <i>pncA2</i> ) .....	26
11.	Cantidad de producto de PCR utilizado para la secuenciación .....	28
12.	Grupos de cepas de acuerdo a su perfil de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea .....	33
13.	Mutaciones presentes en el gen <i>rpsL</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	36
14.	Mutaciones presentes en el gen <i>rrs</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	39

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
15. Mutaciones presentes en el gen <i>katG</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	42
16. Mutaciones presentes en la región promotora del gen <i>inhA</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	44
17. Mutaciones presentes en el gen <i>embB</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	46
18. Mutaciones presentes en el gen <i>pncA</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	50
19. Mutaciones presentes en los genes <i>rpsL</i> , <i>rrs</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> (promotor), <i>rpoB</i> , <i>embB</i> y <i>pncA</i> de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea .....	52
20. Regiones génicas alteradas en su expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO .....	75
21. Genes alterados en sus perfiles de expresión de las cepas H37Rv respecto a CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO .....	76
22. Regiones génicas alteradas en su expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO .....	78
23. Selección de genes alterados en sus perfiles de expresión en las cepas H37Rv y CIBIN 99, aplicando como criterio de selección $\log\text{-}F_{ch}>/1 $ y el estadístico B .....	79

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura genómica del gen <i>rpsL</i> .....	35
2. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>rpsL</i>	35
3. Estructura genómica del gen <i>rrs</i> .....	37
4. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>rrs</i>	37
5. Estructura genómica del gen <i>katG</i> .....	40
6. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>katG</i>	41
7. Estructura genómica del gen <i>inhA</i> .....	43
8. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>inhA</i>	43
9. Estructura genómica del gen <i>embB</i> .....	45
10. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>embB</i>	45
11. Estructura genómica del gen <i>rpoB</i> .....	47
12. Imagen representativa de los productos amplificados para el gen <i>rpoB</i>	48
13. Estructura genómica del gen <i>pncA</i> .....	49
14. Imágenes representativas de los productos amplificados para el gen <i>pncA</i> .....	49
15. Imagen representativa del RNA total obtenido de <i>M. tuberculosis</i>	51
16. Esquema experimental para evaluación de perfiles de expresión genética .....	53
17. Ejemplo de visualización de la intensidad de señal de los microarreglos .....	54
18. Evaluación preliminar de la intensidad de señal de microarreglos	55
19. Gráficas MvA de los datos de microarreglos .....	56

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
20. Análisis comparativo de datos de muestras de microarreglos	57
21. Representación del agrupamiento de genes usando mapa de calor	58
22. Gráfica de volcán de los datos de microarreglos comparando la cepa H37Rv y CIBIN99 .....	59
23. Gráfica 1 de volcán del contraste de intensidad de señal de las cepas H37Rv y CIBIN99 con tratamiento .....	75
24. Gráfica 2 de volcán del contraste de intensidad de señal de las cepas H37Rv y CIBIN99 con tratamiento .....	78

## NOMENCLATURA

°C	grado centígrado
μl	microlitro
BL3	Laboratorio de Bioseguridad nivel 3
bp	( <i>base pairs</i> ) pares de bases
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CTAB	( <i>Cetyl trimethyl Ammonium Bromide</i> ) Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	( <i>desoxyribonucleic acid</i> ) ácido desoxirribunucleico
g	gramo
h	hora
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
log-Fch	logaritmo de veces de cambio o fold change
log-odds	logaritmo de momios o probabilidad
M	molar
MFR	multifármacorresistente
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanogramo
ORF	( <i>Open Reading Frame</i> ) marco abierto de lectura

PCR	( <i>polimerase chain reaction</i> ) reacción en cadena de la polimerasa
RNA	( <i>ribonucleic acid</i> ) ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	( <i>ribosomal ribonucleic acid</i> ) ácido ribonucleico ribosomal
s	segundo
SDS	( <i>sodium dodecyl sulphate</i> ) dodecil sulfato de sodio
TB	tuberculosis
TE	Buffer de Tris y EDTA
WHO	( <i>World Health Organization</i> ) Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

La tuberculosis pulmonar se ha convertido en un problema de salud pública debido al incremento de la fármacorresistencia desarrollada por *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos de primera línea. Se ha propuesto que la condición de resistencia se debe en parte a la acumulación de mutaciones en algunos genes involucrados con los mecanismos de acción de los fármacos, por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo la secuenciación de los genes *rpsL*, *rrs*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* y *pncA* en una selección de aislados clínicos de *M. tuberculosis* que fueron agrupados conforme a los diferentes fenotipos de resistencia a los fármacos de primera línea. Se encontró que de 16 cepas resistentes fenotípicamente a estreptomycin, sólo se hallaron mutaciones en el 25% de las cepas dentro de los genes *rrs* y *rpsL*; el 6.25% mutantes en *rrs* y el 18.75% en gen *rpsL*. De 19 cepas resistentes a isoniazida, el 68.41% mostraron mutaciones en los genes *katG* e *inhA*. El 57.89% en *katG* y 10.52% en promotor *inhA*. De 4 cepas resistentes a etambutol, el 75% mostraron la mutación en el gen *embB*. De manera interesante, la misma mutación fue observada en 3 cepas sensibles a etambutol. Sólo el 23% (3/13) de las cepas resistentes a pirazinamida presentaron mutaciones en el gen *pncA*. Así mismo, se realizó un análisis de expresión diferencial entre las cepas H37Rv pansensible y CIBIN/UMD15-099 (CIBIN99) panresistente a los fármacos de primera línea, utilizando microarreglos genómicos. Se llevó a cabo el análisis de los datos arrojados por los microarreglos Affymetrix. Los resultados mostraron que bajo las mismas condiciones de crecimiento, la cepa H37Rv y la cepa CIBIN99 no tienen diferencia significativa en su expresión génica; sin embargo, al someter a las cepas a un tratamiento con dimetilsulfóxido al 0.1%, se encontró una diferencia significativa entre los transcriptomas de ambas cepas. Estos resultados permiten proponer a un grupo de genes como candidatos relacionados con la fármacorresistencia de *M. tuberculosis*.

## ABSTRACT

Lung tuberculosis has become an important health problem, with an increasing incidence in part because of a drug-resistance developed by *M. tuberculosis* related with gene mutations, which encoded target proteins of drugs. In this work, we performed a nucleotide sequence analyses for *rpsL*, *rrs*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* and *pncA* genes. PCR assays were carried out in 26 clinical isolates classified, according to their drug resistance profile, in eight groups. Mutations on *rpsL* and *rrs* genes were found in 25% of streptomycin resistant isolates; 6.25% corresponding to mutations in *rrs* and 18.75% to mutations in *rpsL*. There were 19 isolates resistant to isoniazid, which 68.41% of them have mutations either in *katG* or *inhA* gene; 57.89% on *katG* gene sequence and 10.52% in *inhA* promoter. Seventy percent of isolates resistant to etambutol have mutations on *embB* gene. Meanwhile, only 23% of pyrazinamide resistant isolates have mutations in *pncA* gene. Expression profile of *M. Tuberculosis* genome was also studied by comparing strain H37Rv, sensitive to first-line anti-tuberculosis drugs, and CIBIN/UMD15-099 (CIBIN99), resistant to the same group of drugs. Comparisons were performed with microarray data analysis using Affymetrix Genechips®. Microarray data were processed, and no statistically significant differences were found between H37Rv and CIBIN99. However, when mycobacterial cultures of same strains were exposed to dimethyl sulfoxide at 0.1%, microarray data revealed statistically significant differences on gene expression profiles between H37Rv and CIBIN99. These findings allow us to propose genes as new candidates associated to drug resistance in *M. tuberculosis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis pulmonar (TB) es una de las principales preocupaciones de la Organización Mundial de la Salud, ya que en los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de esta enfermedad. La mayoría de los casos ocurre en Asia (55%), y en África (30%). Se han reportado casos en todo el mundo incluyendo Europa del Este y América, donde México también es uno de los países afectados. La Organización Mundial de la Salud tiene como una de sus prioridades un plan para la contención de la tuberculosis que pretende disminuir la incidencia, así como reducir la prevalencia y mortalidad para el año 2015 (WHO, 2009).

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico principal de la enfermedad. *M. tuberculosis* es un bacilo cuyas características fisiológicas y estructurales dificultan el tratamiento de la enfermedad. El tratamiento estándar consiste en la combinación de fármacos denominados de primera línea: rifampicina, isoniazida, estreptomina y etambutol o pirazinamida (Coll, 2003).

Recientemente han aparecido cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estos fármacos. Las más difíciles de combatir son las denominadas cepas multifármacorresistentes, las cuales son resistentes a cuando menos isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos más potentes contra *M. tuberculosis* que se conocen actualmente (De La Iglesia and Morbidoni, 2006). La resistencia a los fármacos de primera línea posiblemente se generó por la acumulación de mutaciones debido a una terapia inadecuada. En 2008, se estimó que en el mundo había 440,000 casos de tuberculosis multifármacorresistente (TB MFR), representando el 3.6% de los casos totales de tuberculosis (WHO, 2010).

Actualmente se han identificado algunos de los genes responsables de la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*, los cuales contienen mutaciones en las

secuencias codificantes (Jain and Dixit, 2008; Ramaswamy and Musser, 1998; Somoskovi *et al.*, 2001).

Sin embargo, existe la necesidad de identificar nuevos genes para vincular las características fenotípicas de *M. tuberculosis* resistente a varios fármacos para su adecuada clasificación. Además, a partir de la identificación de dichos genes se puede proponer mecanismos de acción que puedan ser blanco para el tratamiento de TB MFR.

En este trabajo se determinaron las mutaciones asociadas a fármacos de primera línea, y se evaluó el perfil de expresión de genes relacionados con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*.

## 2. HIPÓTESIS

La resistencia de *M. tuberculosis* a fármacos de primera línea es debida a una alteración en la expresión de genes, y no solamente a la presencia de mutaciones en los genes *rpsL*, *rrs*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* y *pncA*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Identificar los genes que están vinculados con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 3.2. Objetivos Particulares

3.2.1. Identificar y seleccionar cepas de *M. tuberculosis* con diversas condiciones de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea en la colección del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

3.2.2. Identificar, en las cepas seleccionadas, las mutaciones relacionadas con la condición de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea.

3.2.3. Evaluar los perfiles de expresión de genes en las cepas resistentes y sensibles a uno o varios fármacos de primera línea.

3.2.4. Identificar genes candidatos para asociarlos a los fenotipos de resistencia a fármacos de primera línea.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Tuberculosis Como Problema de Salud Mundial.

La tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* (WHO, 2009). Durante el 2008, se estimaron 9.4 millones de casos incidentes y 1.3 millones de muertes por tuberculosis (WHO, 2009). La prevalencia de tuberculosis multifármacorresistente (MFR) es la proporción de casos de tuberculosis que presentan resistencia ante los fármacos de primera línea. Los países de Europa del Este, la ex-Unión Soviética, China, y recientemente el África subsahariana se consideran regiones con alta incidencia de TB MFR. Aunado a la infección por *M. tuberculosis*, en la región de Sudáfrica se ha reportado la co-infección de pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (Zager and McNerney, 2008). Además, existen reportes de casos de TB MFR en prácticamente todo el mundo, incluyendo a México.

### 4.2. Resistencia de *M. tuberculosis* a Fármacos.

El tratamiento para Tuberculosis pulmonar, recomendado por la Organización Mundial de la Salud, consiste en un régimen basado en cuatro antibióticos de primera línea: estreptomina (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) o pirazinamida (P) (WHO, 2007). Sin embargo, probablemente debido a factores evolutivos y de tratamientos farmacológicos no adecuados o incompletos se han desarrollado cepas resistentes a estos fármacos (Jain and Dixit, 2008). La resistencia a por lo menos dos principales fármacos antituberculosis (R, I) se denomina multifármacorresistencia (CDC, 2006).

También, la condición de resistencia se ha relacionado con las características estructurales de la pared celular de *M. tuberculosis*, lo cual dificulta la acción de los fármacos anti-TB (Coll, 2003), así como las bombas de flujo que intervienen en reducir la sensibilidad a fármacos antituberculosis (Escribano *et al.*, 2007).

### 4.3. Mecanismos de Resistencia a Fármacos de Primera Línea.

*M. tuberculosis* ha desarrollado su resistencia desde la introducción de los fármacos para su tratamiento. Razones de esta resistencia se debe a una acumulación de mutaciones en regiones codificantes o por la activación de enzimas que metabolizan a los fármacos. Se han reportado los mecanismos de acción de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis. Por ejemplo, el etambutol (etilen-diamino-dibutanol) inhibe la biosíntesis de la pared micobacteriana (Belanger *et al.*, 1996). De manera similar, la pirazinamida inhibe la síntesis de los precursores de ácidos grasos de cadena corta que conforman la pared celular. La isoniazida impide la síntesis de ácidos micólicos. Mientras que la rifampicina inhibe la transcripción al unirse a la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (Parsons *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de la estreptomycinina se fundamenta en el bloqueo de la traducción del RNA mensajero (Coll, 2003).

La resistencia a rifampicina se debe en un 95% de los casos a una mutación en el gen *rpoB*, codificante para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (Negi *et al.*, 2009). Una mutación del gen *katG* altera a la catalasa peroxidasa, lo que inhibe la activación de la isoniazida. Así mismo, una modificación en la subunidad 16S de rRNA confiere resistencia a estreptomycinina; y mutaciones en el gen *embB* se encuentran en la mayoría de los casos de resistencia a etambutol (Jain *et al.*, 2008; Ramaswamy and Musser, 1998; Somoskovi *et al.*, 2001).

#### 4.4. Identificación de la Condición de Resistencia a Fármacos en *M. tuberculosis*.

Recientemente, se ha hecho mucho énfasis en las técnicas que permitan identificar cepas multifármacorresistentes. Estas técnicas están basadas en la identificación de mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea en el genoma de las cepas de *M. tuberculosis* (Chaoui *et al.*, 2009), incluyendo el desarrollo de pruebas de detección rápida para identificar la presencia de las mutaciones mencionadas (Brossier *et al.*, 2010).

Los genes *rpoB* (rifampicina), *katG* (isoniazida), *inhA* (isoniazida y etionamida), *pncA* (pirazinamida), *embB* (etambutol), *rpoB* (rifampicina) *rrs* (estreptomycin), *rpsL* (estreptomycin) y *gyrA* (fluoroquinolonas) han sido evaluados con técnicas moleculares como secuenciación, análisis heterodúplex, *spoligotyping* y microarreglos, para detectar resistencia a fármacos (Cheng *et al.*, 2005). Por ejemplo, Chaoui *et al.* (2009) llevó a cabo un análisis de mutaciones en los genes *katG*, *inhA*, *rrs*, *rpsL* y *embB* de 199 cepas de *M. tuberculosis*. Se encontró que 66 cepas fenotípicamente resistentes a isoniazida, sólo el 77.3% presentaban una mutación en el codón 315 del gen *katG*, y el 3% en el gen *inhp*. Resistencia a estreptomycin se comprobó en 58 aislados, de los cuales el 12.1% tenía alteraciones en el codón 43 de *rpsL*, el 1.7% en el codón 88 y el 3.4% en el codón 512 del gen *rrs*. Para etambutol, de 26 aislados resistentes, se observó la mutación en el codón 306 del gen *embB* en 11 de ellos.

Se han valorado los polimorfismos genéticos involucrados en la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis* utilizando técnicas de PCR, donde se ha reportado la detección rápida y directa de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina (Ruiz *et al.*, 2004). En 2006, se utilizó esta técnica para analizar aislados resistentes de *M. tuberculosis*, encontrando que en el 85.7% de las cepas resistentes presentaron mutación en el aminoácido serina del codón 315 (Ser315) de la secuencia *katG* y que el 100% de los aislados resistentes a etambutol tenían mutaciones en las secuencias para los aminoácidos metionina y glicina de los codones 306 y 406, respectivamente (Met306 y

Gly406) del gen *embB* (Zaki and Goda, 2006). Por otro lado, la combinación de técnicas, como lo son *spoligotyping*, RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR, han sido útiles para relacionar evolutivamente a *M. tuberculosis* con fines epidemiológicos (Augustynowicz-Kopec *et al.*, 2008). La primera técnica (*spoligotyping*) se utilizó en un estudio para hacer un análisis de polimorfismos y secuenciación de genes involucrados con la resistencia a antibióticos. Se encontraron mutaciones de hasta un solo nucleótido en el gen *katG* en un aislado resistente a isoniazida (Post *et al.*, 2004). También se ha utilizado para comparar fenotipos de resistencia con los genotipos de *M. tuberculosis* (Bulut *et al.*, 2009).

Considerando lo anterior, la variabilidad genética de *M. tuberculosis* es un aspecto a tomar en cuenta. Dos Vultos *et al.* (2008) afirman que este microorganismo tiene un genoma relativamente estático, de hasta el 99.9% de conservación de nucleótidos. Sin embargo, los sistemas de reparación, recombinación y replicación funcionan a niveles no óptimos, lo que favorece la aparición de mutaciones espontáneas y su acumulación. Además, se ha reportado una alta frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido cuando se analizaron cepas de todo el mundo. Esta variabilidad genética condiciona a las micobacterias a ser susceptibles o resistentes a uno o varios fármacos.

Sin embargo, es de considerar las posibles limitaciones del uso de técnicas moleculares en la caracterización de cepas resistentes. Zaczek *et al.* (2009) reportaron que la presencia de mutaciones específicas del gen *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* no es suficiente para clasificar una cepa como resistente o sensible a rifampicina.

Considerando lo anterior, se requiere de la implementación de nuevos sistemas de diagnóstico para la detección rápida y oportuna del tipo de cepa de *M. tuberculosis* que está infectado a un individuo en un momento determinado. Esta identificación permitirá iniciar un tratamiento adecuado y oportuno, y así contener la propagación de la enfermedad.

#### **4.5. Relación de la Expresión Génica de *M. tuberculosis* con el Efecto Producido por Fármacos.**

El conocimiento del genoma completo de *M. tuberculosis*, en conjunto con otras herramientas moleculares como la tecnología de microarreglos, ha permitido la comprensión del mecanismo de acción de algunos fármacos antituberculosis mediante el estudio de la expresión diferencial producida por el efecto del mismo. (Betts *et al.*, 2003; Boshoff *et al.*, 2004; Butcher, 2004). También se ha hecho una aproximación utilizando microarreglos para comprender mejor la relación entre la expresión génica de *M. tuberculosis* con la resistencia manifestada por algunas cepas hacia fármacos tuberculosis, como la isoniazida (Fu *et al.*, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se usó la tecnología de microarreglos para la expresión genética como una herramienta para comprender mejor el mecanismo de fármacorresistencia en *M. tuberculosis*.

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Selección de Cepas de *M. tuberculosis*.

Se utilizaron 26 aislados clínicos de *M. tuberculosis* del cepario del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS). Se formaron grupos de acuerdo al fenotipo de resistencia a uno o más fármacos de primera línea, estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, los cuales habían sido previamente caracterizados por el sistema BD BACTEC MGIT 960®. El criterio para formar los grupos fue que al menos 3 cepas compartieran el fenotipo de sensibilidad y/o resistencia a uno o varios fármacos de primera línea. Las cepas seleccionadas se cultivaron en el Laboratorio de Micobacteriología del CIBIN con un nivel de bioseguridad BL3. Se utilizaron como referencia a las cepas H37Rv susceptible a todos los fármacos antituberculosis de primera línea y la cepa CIBIN/UMD15-099 (CIBIN99) resistente a los mismos.

### 5.2. Cultivo de Cepas

La activación de las cepas seleccionadas se llevó a cabo en medio de cultivo Lowenstein-Jensen y se cultivaron en una incubadora Nuair® US airflow CO<sub>2</sub> water jacketed incubator a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por un periodo de 10 a 15 días, hasta la obtención de biomasa suficiente para ensayos posteriores.

La resiembra se llevó a cabo en medio de cultivo Middlebrook 7H9. Se tomó una porción de colonias de *M. tuberculosis* crecida en medio Lowenstein-Jensen, la cual se homogenizó en un tubo de ensayo de 13 × 10 mm conteniendo 2.5 ml de agua desionizada estéril y seis perlas de vidrio. El tubo se agitó en *vórtex* por 3 min, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 min, para reducir el riesgo de diseminar aerosoles. De la suspensión de micobacterias, con una jeringa estéril se inoculó un volumen de 0.15 mL en un tubo de ensayo nuevo de 13 × 10 mm, conteniendo 3 mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 adicionado con 10% de OADC Middlebrook (suplemento que consiste en ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa). Se determinó la turbidez

de la suspensión por medición en un nefelómetro Densimat de BioMérieux ® M005230. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, por dos a tres semanas. Se realizó un pasaje de los cultivos a un volumen de 13 mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9, en tubos cónicos de 50 mL de capacidad, con un inóculo de 1 mL de cultivo, con una densidad de micobacterias equivalente en turbidez al estándar 1 de McFarland (1 unidad McFarland es equivalente a  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de *E. coli*) y se continuó la incubación en condiciones estándar con agitación constante, hasta alcanzar una concentración equivalente a los estándares de McFarland entre 2.5 y 4.5.

### **5.3. Extracción de Ácidos Nucléicos de Cepas de *M. tuberculosis***

#### 5.3.1. Extracción de DNA genómico.

A partir de cultivos sólidos o líquidos de *M. tuberculosis*, se realizó la extracción de DNA utilizando el método descrito por van Soolingen *et al.* (1993) con algunas modificaciones:

##### 5.3.1.1. Extracción de DNA a partir de cultivos de micobacterias crecidas en medio líquido Middlebrook 7H9.

Los cultivos de las cepas de *M. tuberculosis* en Middlebrook 7H9 enriquecido con 10% de OADC fueron centrifugados a 390 rpm durante 20 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada CIEC® centra GP8R. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular fue resuspendido en 500 µl de buffer TE 1×. Se homogenizó la suspensión agitándola en un *vórtex*.

### 5.3.1.2. Extracción de DNA a partir de micobacterias crecidas en medio sólido Lowenstein-Jensen.

Se tomó una porción de colonias crecidas en el medio de cultivo sólido y se resuspendió en un tubo de ensayo conteniendo 2.5 mL de agua desionizada estéril y seis perlas de vidrio. La suspensión se agitó en un *vórtex* durante 5 min. Después de dejar reposar el tubo por 2 min, se transfirieron 500 µl de la suspensión de micobacterias a microtubos de 1.5 mL; los cuales se colocaron en baño maría por 1 h a 80 °C para inactivar a las micobacterias.

Se añadieron 50 µl de lisozima [10 mg/ml] al tubo con la suspensión, y después de agitarlo en un *vórtex*, la preparación se dejó incubando a 37 °C toda la noche. Se agregaron 70 µl de SDS al 10% a cada tubo y 6 µl de proteinasa K [10 mg/ml]. Las preparaciones se homogenizaron en un *vórtex*. Los tubos se incubaron a 65 °C por 10 min en un bloque térmico Thermolyne ® Dry-bath.

Se añadieron a cada tubo 100 µl de NaCl [5M], 80 µl de CTAB/NaCl [0.274 M/0.68 M]. Las mezclas se homogenizaron en un *vórtex*. Las muestras se volvieron a calentar a 65°C en bloque térmico por 10 min. A cada tubo se le agregaron 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Todas las preparaciones se agitaron por 10 s en un *vórtex*. Los tubos con las mezclas arriba descritas se centrifugaron a temperatura ambiente por 5 min a 12,000 g; y el sobrenadante fue transferido a otro microtubo. El DNA de cada preparación se precipitó añadiendo 0.6 volúmenes (360µl) de isopropanol y se dejó a -20 °C toda la noche.

Todos los tubos se centrifugaron a 12,000 g por 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron los precipitados con etanol frío al 70%, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones del punto anterior. Se eliminó el sobrenadante de cada tubo y la pastilla de DNA se resuspendió en 20 µl de buffer TE 0.1×.

Para constatar la presencia e integridad del DNA, de cada preparación se tomó una muestra de 5  $\mu$ L y se sometió a una separación electroforética en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [10 mg/ml].

Se confirmó la funcionalidad del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen constitutivo *rpsL*, el cual codifica para la subunidad 30S del RNA ribosomal.

### 5.3.2. Extracción de RNA total.

La extracción de RNA de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* se llevó a cabo a partir de cultivos líquidos usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los cultivos micobacterianos se incubaron en medio Middlebrook, hasta que alcanzaron una turbidez equivalente a los estándares 2.5 y 4.5 de McFarland.

Se colocaron 10 mL de cada cultivo en tubos cónicos de 50 mL de capacidad y se centrifugaron a 390 rpm por 20 min a 4 °C, en una centrífuga CIEC® centra GP8R. Se eliminó el sobrenadante de cada preparación y la pastilla de micobacterias se resuspendió en 800  $\mu$ l de TRIzol®. Se transfirieron las mezclas, por separado, a microtubos de 1.5 mL y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se agitaron 3 veces por inversión y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente.

Se transfirió la suspensión de TRIzol y micobacterias a tubos Fast Prep® (Qbiogene Inc), el cual contenía seis perlas de vidrio. Los tubos se sometieron a tres ciclos de 20 s cada uno en el agitador Fast Prep® ajustado al nivel 6 de velocidad; después de cada ciclo, los tubos se colocaron en hielo por 2 min.

Las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 3 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. A cada microtubo se le agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, estas preparaciones se mezclaron por inversión por 10 s, y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente.

Los microtubos se centrifugaron a 12,000 *g* por 15 min a 4 °C, y la fase acuosa se transfirió a un microtubo nuevo. Al sobrenadante se añadieron 500 µl de isopropanol. Los tubos se agitaron por inversión y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente.

Las preparaciones se centrifugaron a 12,000 *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla de ácidos nucleicos (DNA y RNA) se lavó con 1 ml de etanol al 75%. El tubo se volvió a centrifugar a 7,500 *g* por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la muestra de RNA total se resuspendió en 35 µl de TE 1× estéril.

Se determinó la concentración y pureza del RNA, midiendo la absorbancia (a 260 y 280 nm) de cada muestra en un espectrofotómetro Nanodrop Thermo®. Además, se constató la integridad del RNA mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL).

#### **5.4. Ensayos de PCR**

Se usaron 100 ng de DNA genómico de la cepa de referencia H37Rv para estandarizar y amplificar los genes involucrados con la condición de fármacorresistencia. Para ello se usaron, secuencialmente, la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y la enzima Phusion® (Finnzymes) o *Pfu* Ultra® (Stratagene). Los iniciadores utilizados en los ensayos de PCR se muestran en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación optimizadas con las enzimas de alta fidelidad se muestran en las Tablas 2 a la 10.

Tabla 1

Oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos génicos en *M. tuberculosis*.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>rpsL</i>	STR52 STR 34	5'-GTCAAGACCGCGGCTCTGAA-3' 5'-TTCTTGACACCCTGCGTATC-3'	272 bp	Chaoui <i>et al.</i> , 2009
<i>rrs</i>	F1	5'-GTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG-3'	805 bp	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2004
	R1	5'-CACCTCAGCGTCAGTTACTG-3'	821 bp	
	F2	5'-CAGTAACTGACGCTGAGGAG-3'		
	R2	5'-GTTTTCGTGGTGCTCCTTAG-3'		
<i>katG</i>	Tb87	5'-GTTGTCCCATTTCGTCGGGG-3'	210 bp	Zaki and Goda, 2006
	Tb86	5'-GAAACAGCGGCGCTGATCGT-3'		
<i>inhA</i> (promotor)	inhAP3	5'-CGCAGCCAGGGCCTCGCTG-3'	246 bp	Chaoui <i>et al.</i> , 2009
	inhAP5	5'-CTCCGGTAACCAGGACTGA-3'		
<i>embB</i>	embBF	5'-TGATATTCGGCTTCCTGCTC-3'	417 bp	Zaki and Goda, 2006
	embBR	5'-ACCGCTCGATCAGCACATAG-3'		
<i>rpoB</i>	Forward	5'-ATCAACATCCGGCCGGTGGT-3'	257 bp	Mariam <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	5'-TACACCGACAGCGAGCCGAT-3'		
<i>pncA</i>	F1	5'-GCGCACACAATGATCGGTGG-3'	526 bp	Endoh <i>et al.</i> , 2002
	R3	5'-GTCGGTCATGTTGCGGATCG-3'	521 bp	
	F2	5'-ATCAGCGACTACCTGGCCGA-3'		
	R4	5'-TGCTTGCGGCGAGCGCTCCA-3'		

Tabla 2

Condiciones de amplificación por PCR para gen *rpsL*.

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>rpsL</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 30 s	72°C 7 min
	Buffer Phusion®	1×					
	dNTP's mix	0.2mM					
	STR 52	5 ng/µl					
	STR34	5 ng/µl					
	Phusion® DNA polimerasa	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 3

Condiciones de amplificación por PCR para gen *rrs* (fragmento *rrsI*).

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>rrsI</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min
	Buffer Phusion®	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	<i>rrs</i> F1	5 ng/µl					
	<i>rrs</i> R1	5 ng/µl					
	Phusion® DNA polimerasa	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 4

Condiciones de amplificación por PCR para gen *rrs* (fragmento *rrs2*).

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				Extensión final
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
<i>rrs2</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	<i>rrs</i> F2	5 ng/µl					
	<i>rrs</i> R2	5ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 5

Condiciones de amplificación por PCR para gen *katG*.

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				Extensión final
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
<i>katG</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 30 s	72°C 7 min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	Tb86	5 ng/µl					
	Tb87	5 ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 6

Condiciones de amplificación por PCR para gen *inhA*.

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>inhA</i> (promotor)	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5min	94°C 40s	57°C 40s	72°C 40s	72°C 7min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	<i>inhA</i> P3	5 ng/µl					
	<i>inhA</i> P5	5 ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 7

Condiciones de amplificación por PCR para gen *embB*.

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>embB</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 40 s	60°C 40 s	72°C 40 s	72°C 7 min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	<i>embB</i> F	5 ng/µl					
	<i>embB</i> R	5 ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 8

Condiciones de amplificación por PCR para gen *rpoB*.

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>rpoB</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 40 s	57°C 40 s	72°C 40 s	72°C 7 min
	Buffer <i>Taq</i>	1×					
	MgCl <sub>2</sub>	1.5mM					
	dNTP's mix	0.2mM					
	Forward	5 ng/µl					
	Forward	5 ng/µl					
	<i>Taq</i> Polimerasa	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 9

Condiciones de amplificación por PCR para gen *pncA* (fragmento *pncA1*).

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>pncA1</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 40 s	60°C 40 s	72°C 40 s	72°C 7 min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM c/u					
	<i>pncA</i> F1	5 ng/µl					
	<i>pncA</i> R3	5 ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Tabla 10

Condiciones de amplificación por PCR para gen *pncA* (fragmento *pncA2*).

Gen	Reacción		Ciclo (× 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>pncA2</i>	Agua desionizada	a 25 µl	95°C 5 min	94°C 40 s	60°C 40 s	72°C 40 s	72°C 7 min
	Buffer <i>Pfu</i> Ultra	1×					
	dNTP's mix	0.2 mM					
	<i>pncA</i> F2	5 ng/µl					
	<i>pncA</i> R4	5 ng/µl					
	<i>Pfu</i> Ultra	0.025 U/µl					
	DNA templado	2.4 ng/µl					

Para la visualización de los productos de amplificación, se llevó a cabo la separación de 5 µl de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml). Las imágenes de los geles fueron registradas en un fotodocumentador UVP.

## 5.5. Purificación de los Productos de PCR

Los productos de la amplificación, después de la electroforesis, fueron extraídos de los geles de agarosa utilizando los kits de purificación de ácidos nucleicos GeneClean® (Qbiogene Inc.) y Wizzard® (Promega) de acuerdo a las instrucciones de cada proveedor.

Para el caso del gen *rrs*, los productos de amplificación fueron recuperados por precipitación etanólica, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Después de la amplificación, las muestras fueron transferidas a microtubos de 1.5 mL. Se añadieron 2 µl de EDTA [125 mM] pH 8.0, 2 µl de acetato de sodio [3M] y 50 µl de etanol absoluto. La mezcla de precipitación se agitó en *vórtex* y se incubó por 15 min a temperatura ambiente.

El producto se centrifugó a 2,500 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y al tubo con la pastilla de DNA se adicionó 70 µl de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó a 1,650 g por 15 min a 4 °C. Se repitió el paso anterior de lavado con etanol una vez más.

La pastilla lavada de DNA se resuspendió en 20µl de agua libre de nucleasas. Se determinó la cantidad de producto recuperado por espectrofotometría a 260 y 280 nm, usando el equipo Nanodrop®.

## 5.6. Marcaje, Precipitación y Secuenciación de los Productos de PCR

Los productos de PCR purificados se marcaron usando el kit de secuenciación BigDye V3.1® (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó una cantidad determinada del producto de PCR dependiendo de su tamaño (Tabla 11) con 4 µl del reactivo BigDye, 1 µl de uno de los oligonucleótidos [100 ng/µl], 4 µl de buffer BigDye y agua libre de nucleasas a un volumen final de 20 µl.

Para la reacción de marcaje se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 34 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 15 s, y 60°C por 4 min.

Tabla 11

Cantidad de producto de PCR utilizado para la secuenciación.

<b>Tamaño del templado (bp)</b>	<b>Cantidad (ng)</b>
100-200	1-3
200-500	3-10
500-1000	5-20

La eliminación de nucleótidos no incorporados se llevó a cabo mediante precipitación etanólica del producto marcado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

A la reacción de marcaje (20 µl) se le añadieron 2 µl de EDTA [125 mM] pH 8.0, 2 µl de acetato de sodio [3M] y 50 µl de etanol absoluto. La mezcla de precipitación se agitó con un *vórtex* y se incubó por 15 min a temperatura ambiente.

La muestra se centrifugó a 2,500 g por 30 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se adicionaron 70 µl de etanol al 70% al tubo con la pastilla de DNA; y nuevamente se centrifugó a 1,650 g por 15 min a 4 °C. Se repitió el paso de lavado con etanol al 70%.

La muestra de DNA, ya precipitada y marcada, se resuspendió en 10 µl de formamida (Applied Biosystems) y se incubó por 2 min a 95 °C. El tubo con la muestra de DNA se colocó en hielo durante 5 min.

La totalidad del material de cada muestra se colocó en una placa de 96 pozos y se llevó a cabo la secuenciación automatizada en el equipo 3130xl de Applied Biosystems, usando el software Data collection v3.0 (Applied Biosystems)

### **5.7. Análisis de las Secuencias**

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software SeqScape® ver 2.5 (Applied Biosystems), y como referencia el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, reportada en GenBank (Número de acceso NC\_000962.2).

### **5.8. Análisis de Expresión Usando Microarreglos**

Las muestras de RNA total obtenidas por duplicado de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*, sin tratamiento o con tratamiento con DMSO (ver Apéndice I), fueron enviadas al Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN) para su marcaje e hibridación en microarreglos genómicos Affymetrix.

Los Genechips® de Affymetrix fueron diseñados tomando como base la secuencia genómica de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Los Genechips® contienen todos los marcos abiertos de lectura (3,924 ORFs), 738 regiones intergénicas, así como 20

sondas de apareamiento perfecto y 20 de apareamiento imperfecto como controles positivos y negativos, respectivamente.

Tanto el marcaje y la hibridación de cDNA en los microarreglos fueron realizados de acuerdo con el protocolo establecido por Affymetrix. La lectura de los Genechips® se llevó a cabo usando el software Microarray Analysis Suite 5.0 (MAS5, Affymetrix). El análisis de los datos fue realizado con el apoyo de: 1) Dra. Claudia Rangel Escareño, del Departamento de Genómica Computacional del INMEGEN, y 2) el Licenciado en Biotecnología Genómica José Dávila Velderrain de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La evaluación de la calidad de los datos fue realizada utilizando el programa ArrayQualityMetrics del paquete Bioconductor en la plataforma R.

### **5.9. Análisis Estadístico de la Expresión Diferencial.**

Con el objetivo de identificar la modificación de genes entre cepas H37Rv y CIBIN99, se utilizaron los siguientes criterios para la selección de genes candidatos:

El valor de  $\log-Fch$ . Representa la razón de cambio en logaritmo base 2 entre dos condiciones (microarreglos) experimentales para cada gen. Los valores de  $\log-Fch > 0$  indican una expresión incrementada de una condición respecto a otra en determinado gen; los valores  $\log-Fch < 0$  muestran una disminución en la expresión.

Se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\log FCh = \log_2 \left( \frac{gH}{gK} \right)$$

Donde:

$g$ =gen analizado

$H$ =condición experimental

$K$ =condición experimental diferente de H.

Por lo tanto, un valor  $\log-Fch \geq |1|$  representa un gen expresado diferencialmente al menos dos veces entre H y K.

Estadístico B: *log-odds*. Representa la posibilidad de que el gen este diferencialmente expresado. La posibilidad (*odds*) a favor de un evento se representa con la fórmula:

$$B = \log \frac{p}{(1 - p)}$$

Donde:

$p$  = es la probabilidad de que el gen esté diferencialmente expresado

$1 - p$  = es la probabilidad de que no exista cambio de expresión.

Así, un valor de estadístico  $B = 0$  indica una probabilidad del 50% de que un gen este diferencialmente expresado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Selección de Cepas para el Estudio

Con la finalidad de evaluar las correlaciones reportadas previamente entre las mutaciones de los genes *rpsL*, *rrs*, *katG*, *inhA* (promotor), *embB*, *rpoB* y *pncA*, y el fenotipo de susceptibilidad y/o resistencia a fármacos de primera línea, se seleccionaron cepas provenientes de la colección del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, las cuales habían sido previamente caracterizadas por su fenotipo de sensibilidad y resistencia a los cinco medicamentos de primera línea (estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida).

El criterio de selección se basó en que por lo menos tres cepas tuvieran el mismo perfil de resistencia y/o susceptibilidad a los 5 fármacos arriba mencionados. Se formaron 8 grupos de cepas con diferente perfil de fármacorresistencia (Tabla 12). Se incluyeron en el análisis a las cepas de referencia: H37Rv pansensible y CIBIN99 panrrresistente a los 5 fármacos de primera línea.

Tabla 12

Grupos de cepas de acuerdo a su perfil de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea

Grupo	ID Cepa	Fenotipo				
		S	I	R	E	P
1	986	r	r	r	r	r
	1007					
	1025					
2	813	r	r	r	s	r
	852					
	918					
3	840	r	r	r	s	s
	929					
	1068					
4	804	r	r	s	s	s
	998					
	1003					
5	814	r	s	s	s	s
	903					
	1044					
6	803	s	r	r	s	r
	822					
	983					
7	867	s	r	s	s	s
	939					
	943					
8	806	s	s	s	s	s
	801					
	810					
Referencias	H37Rv	s	s	s	s	s
	CIBIN99	r	r	r	r	r

ID, identificación; S, estreptomycin; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida; s, sensible; r, resistente.

## **6.2. Establecimiento de las Condiciones para la Identificación de Mutaciones en Cepas de *M. tuberculosis* con Diferentes Perfiles de Resistencia y Sensibilidad a Fármacos de Primera Línea**

Con el objetivo de identificar las mutaciones más comúnmente vinculadas con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*, se realizó una búsqueda bibliográfica, y con la información obtenida se llevó a cabo la selección de los oligonucleótidos necesarios para generación de los amplicones de interés y posteriormente realizar la secuenciación de los mismos (Tabla 1).

Se llevó a cabo la estandarización de las condiciones de amplificación para cada uno de los genes en dos etapas: 1) se utilizó como molde al DNA genómico proveniente de la cepa de referencia H37Rv, y como enzima a la *Taq* DNA polimerasa. Para obtener los productos esperados se realizaron ajustes para la amplificación, 2) Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación con *Taq* DNA polimerasa, se utilizaron éstas para la amplificación con enzimas DNA polimerasas de alta fidelidad, esto es *Pfu* Ultra® y Phusion®.

Una vez que se obtuvieron los productos de amplificación para la cepa de referencia H37Rv, se utilizaron las condiciones de amplificación optimizadas para amplificar los fragmentos en las cepas de interés (Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14).

## **6.3. Identificación de Mutaciones en los Genes *rrs* y *rpsL* que Confieren Resistencia a Estreptomicina**

De las 16 cepas con fenotipo de resistencia a estreptomicina, incluyendo a la cepa CIBIN99, sólo se encontraron mutaciones en el 25% de las cepas dentro de los genes *rpsL* y *rrs*; el 6.25% (1/16) presentó la mutación transicional A515T en el gen *rrs* (Figura 3 y Tabla 14), mientras que el 18.75% (3/16) de las cepas resistentes tienen la sustitución del aminoácido lisina por arginina en la posición 43 (Lys43Arg) en el gen *rpsL* (Figura 1 y Tabla 13).

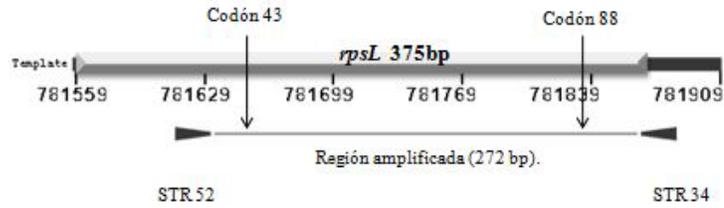


Figura 1. **Estructura genómica del gen *rpsL***. La secuencia codificante está resaltada por la línea y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 781559 a 781909) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal, donde los oligonucleótidos (STR52 y STR34) están señalados por cabezas de flecha (▶◀) y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (272bp). Las mutaciones y su ubicación han sido señaladas por las flechas verticales, donde el codón 43 corresponde a la mutación Lys43Arg y el codón 88 a la mutación Lys88Arg.

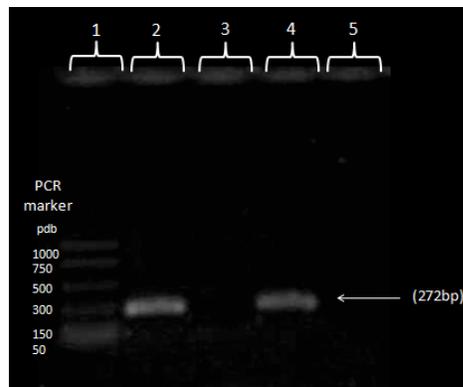


Figura 2. **Imagen representativa de los productos amplificados para el gen *rpsL* de *M. tuberculosis***. Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa; carril 3, control negativo; carril 4, producto amplificado con DNA polimerasa Phusion®; carril 5, control negativo. El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

Tabla 13

Mutaciones presentes en el gen *rpsL* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutaciones*		Fenotipo**				
		Lys43Arg	Lys88Arg	S	I	R	E	P
1	986							
	1007			r	r	r	r	r
	1025							
2	813							
	852	X		r	r	r	s	r
	918	X						
3	840							
	929			r	r	r	s	s
	1068	X						
4	804							
	998			r	r	s	s	s
	1003							
5	814							
	903			r	s	s	s	s
	1044							
6	803							
	822			s	r	r	s	r
	983							
7	867							
	939			s	r	s	s	s
	943							
8	806							
	801			s	s	s	s	s
	810							
Referencia	H37Rv			s	s	s	s	s
	CIBIN99	X		r	r	r	r	r

ID: Identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X.

\*\* SIRE: S, estreptomicina; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida.

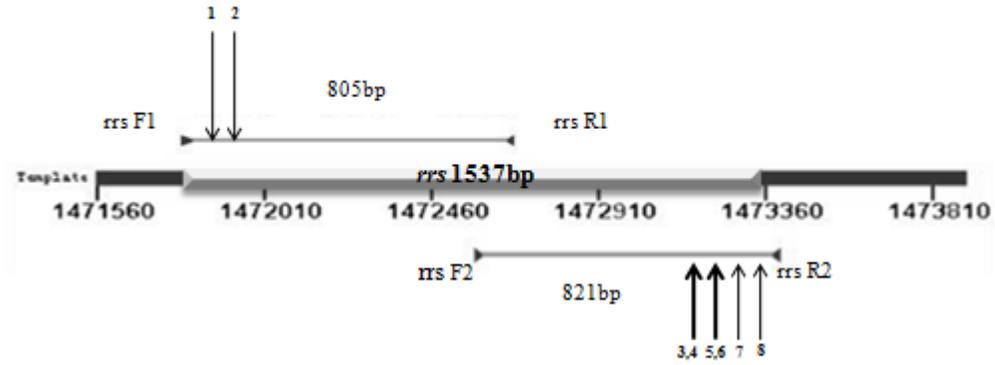
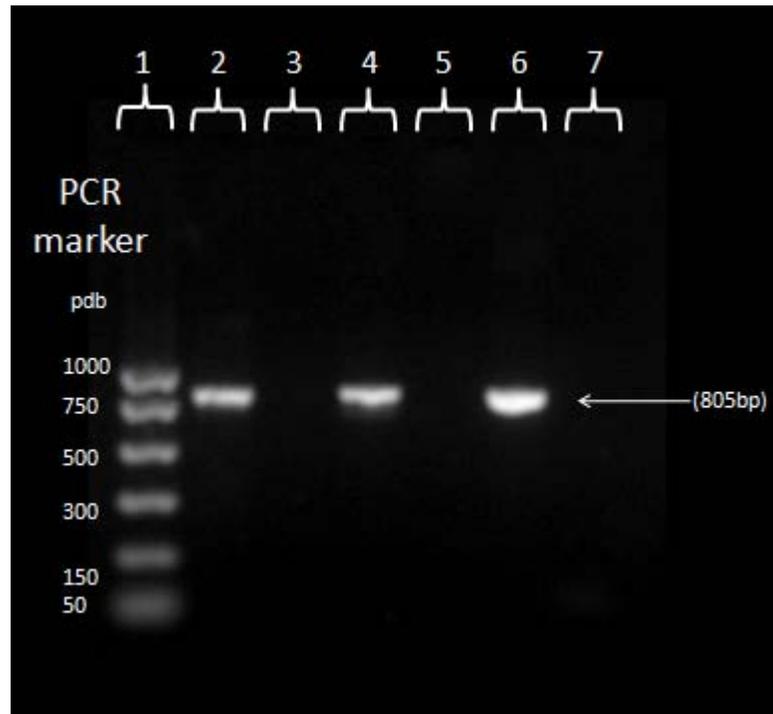


Figura 3. **Estructura genómica del gen *rrs*.** La secuencia codificante está resaltada por la línea  y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 1471560 a 1473810) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. Los productos de amplificación están indicados por las líneas horizontales , donde los oligonucleótidos (rrsF1, rrsR1, rrsF2 y rrsR2) están señalados por cabezas de flecha () y los productos amplificados se muestran en pares de bases (bp). Las mutaciones y su ubicación han sido señaladas por las flechas verticales, donde la numeración corresponde a 1 (A514T), 2 (C517T), 3 (G1332A), 4 (A1338C), 5 (A1401G), 6 (C1402T), 7 (C1443G), y 8 (T1521C).

A



B

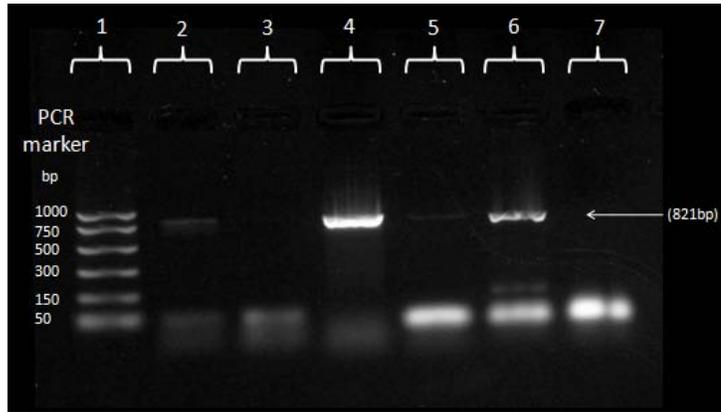


Figura 4. **Imagen representativa de los productos amplificados para el gen *rrs* de *M. tuberculosis*.** Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Panel A, Fragmento 5' obtenido con los *primers* *rrsF1* y *rrsR1*, panel B, Fragmento 3' obtenido con los *primers* *rrsF2* y *rrsR2*. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa; carril 3, Control negativo; carril 4, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra®; carril 5, control negativo; carril 6, producto amplificado con DNA polimerasa Phusion®; carril 7, control negativo. El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

Tabla 14

Mutaciones presentes en el gen *rrs* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutaciones*								Fenotipo**				
		A514T	C517T	G1332A	A1338C	A1401G	C1402T	C1443G	T1521C	S	I	R	E	P
1	986													
	1007									r	r	r	r	r
	1025													
2	813	X												
	852									r	r	r	s	r
	918													
3	840													
	929									r	r	r	s	s
	1068													
4	804													
	998									r	r	s	s	s
	1003													
5	814													
	903									r	s	s	s	s
	1044													
6	803													
	822									s	r	r	s	r
	983													
7	867													
	939									s	r	s	s	s
	943													
8	806													
	801									s	s	s	s	s
	810													
Referencias	H37Rv									s	s	s	s	s
	CIBIN99									r	r	r	r	r

ID: Identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X, y las zonas grises corresponden a los datos no obtenidos.

\*\*SIREP: S, estreptomycin; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida. s, sensible; r, resistente.

#### 6.4. Identificación de Mutaciones en los Genes *katG* e *inhA* que Confieren Resistencia a Isoniazida

De las 19 cepas que se clasificaron como resistentes a isoniazida, el 68.41% (13/19) tienen mutaciones en los genes *katG* e *inhA*. En el caso del gen *katG*, el 57.89% (11/19) de las cepas tuvieron la mutación en el codón 315, donde el aminoácido serina fue sustituido por los aminoácidos arginina (9/19), ácido aspártico (1/19) o treonina (1/19) (Figura 5 y Tabla 15). Respecto a las mutaciones en la región promotora del gen *inhA*, se encontró que el 10.52% (2/19) de las cepas resistentes a isoniazida tienen mutaciones en las posiciones -8 (T>G) y -15 (C>T) (Figura 7 y Tabla 16).

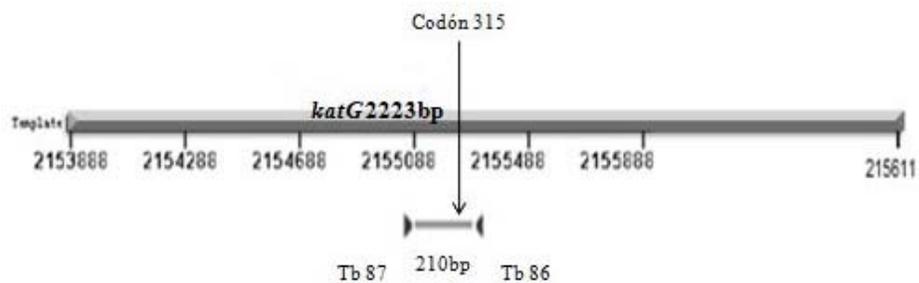


Figura 5. **Estructura genómica del gen *katG***. La secuencia codificante está resaltada por la línea  y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 2153888 a 2156111) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal , donde los oligonucleótidos (Tb87 y Tb86) están señalados por cabezas de flecha (  ) y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (bp). La mutación del aminoácido serina en la posición 315 ha sido señalada por una flecha vertical.

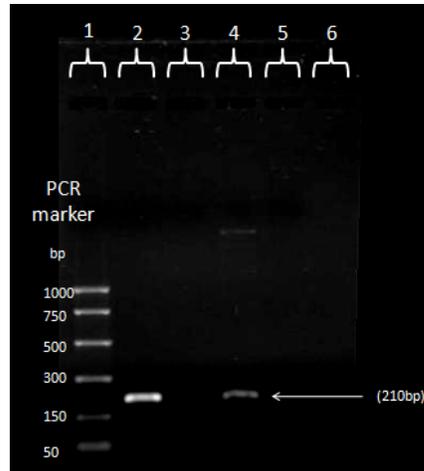


Figura 6. **Imagen representativa de los productos amplificados para el gen *katG* de *M. tuberculosis*.** Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa; carril 3, Control negativo; carril 4, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra®; carril 5, control negativo. El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

Tabla 15

Mutaciones presentes en el gen *katG* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutación Ser315*			Fenotipo**				
		Arg	Asp	Thr	S	I	R	E	P
1	986	X							
	1007				r	r	r	r	r
	1025								
2	813								
	852			X	r	r	r	s	r
	918	X							
3	840								
	929	X			r	r	r	s	s
	1068								
4	804								
	998		X		r	r	s	s	s
	1003	X							
5	814								
	903				r	s	s	s	s
	1044								
6	803	X							
	822	X			s	r	r	s	r
	983	X							
7	867	X							
	939				s	r	s	s	s
	943								
8	806								
	801				s	s	s	s	s
	810								
Referencia	H37Rv				s	s	s	s	s
	CIBIN99	X			r	r	r	r	r

ID: Identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X

\*\*SIREP: S, estreptomycin; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida.  
s, sensible; r, resistente.

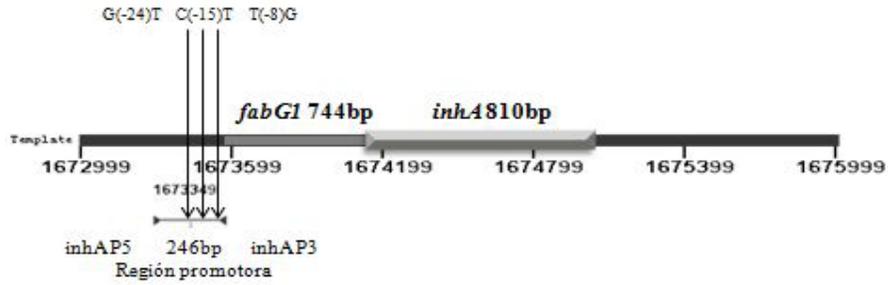


Figura 7. **Estructura genómica del gen *inhA*.** La secuencia codificante está resaltada por la línea y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 1672999 a 1675999) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El gen *fabG* se encuentra dentro del operón que transcribe también al gen *inhA*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal, donde los oligonucleótidos (*inhAP5* e *inhAP3*) están señalados por cabezas de flecha (▶◀) y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (bp). Las mutaciones en la región del promotor y los cambios reportados están señalados por las flechas verticales.

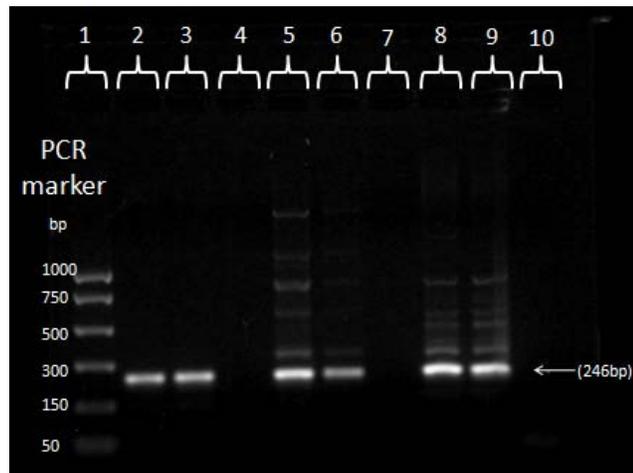


Figura 8. **Imagen representativa de los productos amplificados para el gen *inhA* de *M. tuberculosis*.** Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa y con temperatura de alineamiento a 55 °C; carril 3, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa y con temperatura de alineamiento a 57°C; carril 4, control negativo; carril 5, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra® y con temperatura de alineamiento a 55°C; carril 6, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra® y con temperatura de alineamiento a 57°C; carril 7, control negativo; carril 8, producto amplificado con DNA polimerasa *Phusion*® y con temperatura de alineamiento a 55 °C; carril 9, producto amplificado con DNA polimerasa *Phusion*® y con temperatura de alineamiento a 55 °C; carril 10, control negativo. El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

Tabla 16

Mutaciones presentes en la región promotora del gen *inhA* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutaciones			Fenotipo				
		G(-24)T	C(-15)T	T(-8)G	S	I	R	E	P
1	986								
	1007				r	r	r	r	r
	1025								
2	813			X					
	852				r	r	r	s	r
	918								
3	840		X						
	929				r	r	r	s	s
	1068								
4	804								
	998				r	r	s	s	s
	1003								
5	814								
	903				r	s	s	s	s
	1044								
6	803								
	822				s	r	r	s	r
	983								
7	867								
	939				s	r	s	s	s
	943								
8	806								
	801				s	s	s	s	s
	810								
Referencia	H37Rv				s	s	s	s	s
	CIBIN99				r	r	r	r	r

ID: Identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X

\*\*SIREP: S, estreptomycin; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida.  
s, sensible; r, resistente.

## 6.5. Identificación de Mutaciones en el gen *embB* que Confieren Resistencia a Etambutol

De las 4 cepas resistentes fenotípicamente a etambutol, el 75% tienen la sustitución del aminoácido metionina en el codón 306 por isoleucina (Figura 9 y Tabla 17). Además, la misma mutación fue observada en 3 cepas sensibles a etambutol (cepas 822, 983 y 1003 en Tabla 17).

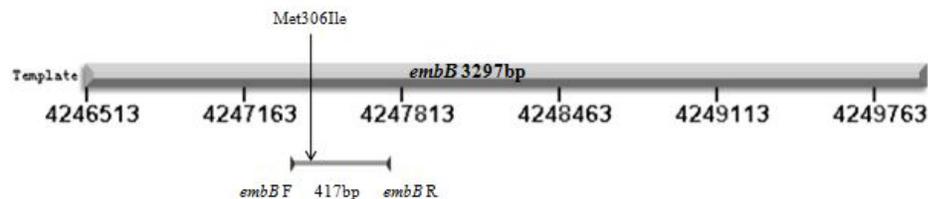


Figura 9. **Estructura genómica del gen *embB*.** La secuencia codificante está resaltada por la línea y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 4246513 a 4249763) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal, donde los oligonucleótidos (*embBF* y *embBR*) están señalados por cabezas de flecha ( ) y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (bp). La mutación del codón 306, donde se sustituye el aminoácido metionina por isoleucina, está señalada por la flecha vertical.

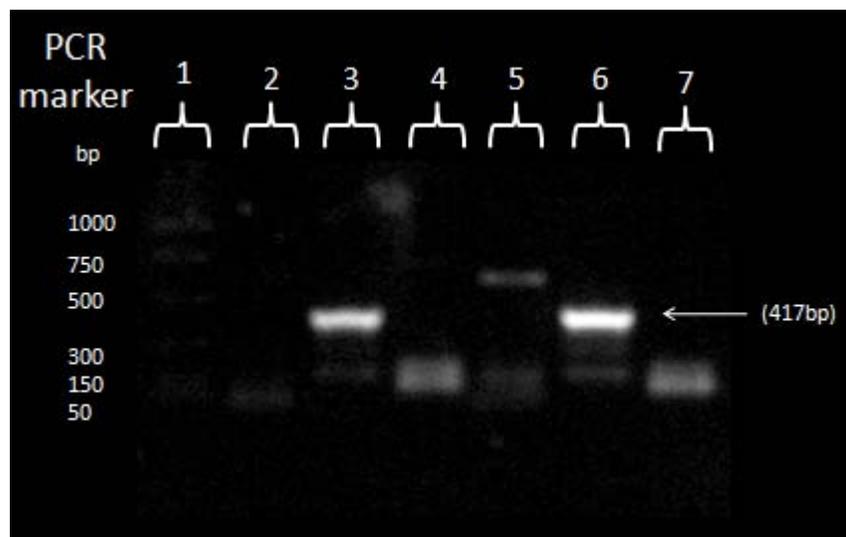


Figura 10. **Imagen representativa de los productos amplificados para el *embB* de *M. tuberculosis*.** Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa y 1.5 mM  $MgCl_2$ ; carril 3, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa y 2.5 mM  $MgCl_2$ ; carril 4, control negativo; carril 5, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra® y 1.5 mM  $MgCl_2$ ; carril 6, producto amplificado con DNA polimerasa *Pfu* Ultra® y 2.5 mM  $MgCl_2$ ; carril 7, control negativo. El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

Tabla 17

Mutaciones presentes en el gen *embB* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutaciones*	Fenotipo**				
		Met306Ile	S	I	R	E	P
1	986		r	r	r	r	r
	1007	X					
	1025	X					
2	813		r	r	r	s	r
	852						
	918						
3	840		r	r	r	s	s
	929						
	1068						
4	804		r	r	s	s	s
	998						
	1003	X					
5	814		r	s	s	s	s
	903						
	1044						
6	803		s	r	r	s	r
	822	X					
	983	X					
7	867		s	r	s	s	s
	939						
	943						
8	806		s	s	s	s	s
	801						
	810						
Referencia	H37Rv		s	s	s	s	s
	CIBIN 99	X	r	r	r	r	r

ID: Identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X.

\*\*SIREP: S, estreptomycin; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida.  
s, sensible; r, resistente.

## 6.6. Identificación de Mutaciones en el gen *rpoB* que Confieren Resistencia a Rifampicina

Durante la estandarización de las condiciones para amplificar un fragmento del gen *rpoB* se logró obtener el amplicón del tamaño esperado de 257 bp con la enzima *Taq* DNA polimerasa (Figura 11 y Figura 12).

Se realizaron ajustes en la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y en la concentración de  $MgCl_2$  usando las enzimas de alta fidelidad, y finalmente se obtuvo el amplicón del tamaño esperado (Figura 12). Sin embargo, al obtener las secuencias nucleotídicas de 13 muestras distintas, se encontró que ninguna de ellas correspondía a la reportada en el GenBank. Entonces, la amplificación y secuenciación de esta región no pudo definirse.

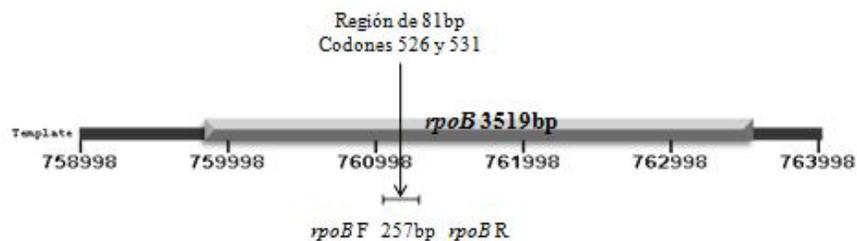


Figura 11. **Estructura genómica del gen *rpoB*.** La secuencia codificante está resaltada por la línea  y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 758998 a 763998) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal , donde los oligonucleótidos (*rpoBF* y *rpoBR*) están señalados por cabezas de flecha () y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (bp). Las mutaciones en los codones 526 y 531 están señalados por la flecha vertical.

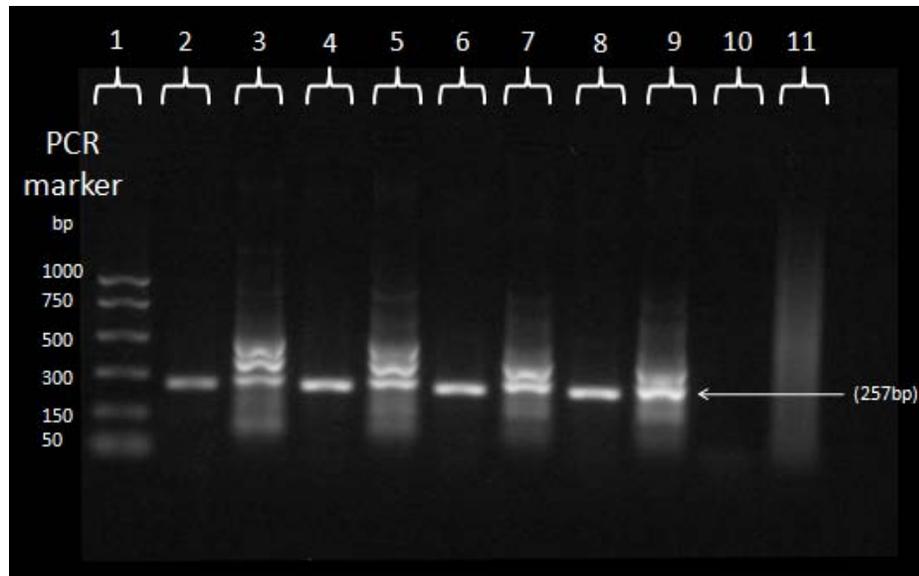


Figura 12. **Imagen representativa de los productos amplificados para el gen *rpoB* de *M. tuberculosis*.** Los productos fueron separados en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa, con una concentración de 2 mM de  $MgCl_2$ ; carril 3 producto amplificado con *Pfu* Ultra®, con una concentración de 2 mM de  $MgCl_2$ ; carril 4, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa con una concentración de 2.5 mM de  $MgCl_2$ ; carril 5, producto amplificado con *Pfu* Ultra®, con una concentración de 2.5 mM de  $MgCl_2$  control negativo; carril 6 producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa con una concentración de 3 mM de  $MgCl_2$ ; carril 7, producto amplificado con *Pfu* Ultra®, con una concentración de 3 mM de  $MgCl_2$ ; carril 8, producto amplificado con *Taq* DNA polimerasa con una concentración de 3.5 mM de  $MgCl_2$ ; carril 9, producto amplificado con *Pfu* Ultra®, con una concentración de 3.5 mM de  $MgCl_2$ ; carril 10, control negativo de PCR con *Taq* DNA polimerasa; carril 11, control negativo de PCR con *Pfu* Ultra®, El peso molecular del producto amplificado está indicado por la flecha en el extremo derecho.

### 6.7. Identificación de Mutaciones en el Gen *pncA* que Confieren Resistencia a Pirazinamida

De las 13 cepas que mostraron resistencia a pirazinamida, sólo el 23% (3/13) de ellas tienen mutaciones en el gen *pncA* (Tabla 18). Una cepa tiene una inserción de una adenina entre las posiciones 140 y 141 de la secuencia codificante para el gen *pncA* (Figura. No 13). Además, se observó que otra cepa tuvo la sustitución del aminoácido treonina, en la posición 135, por alanina. Y por último, se encontró una sustitución de alanina, en la posición 146 por treonina en una cepa con resistencia a pirazinamida. En contraste, dos cepas sensibles a pirazinamida (810 y 903) tienen sustituciones en los codones 135 y 137, de los aminoácidos treonina por alanina, y de histidina por glutamina, respectivamente.

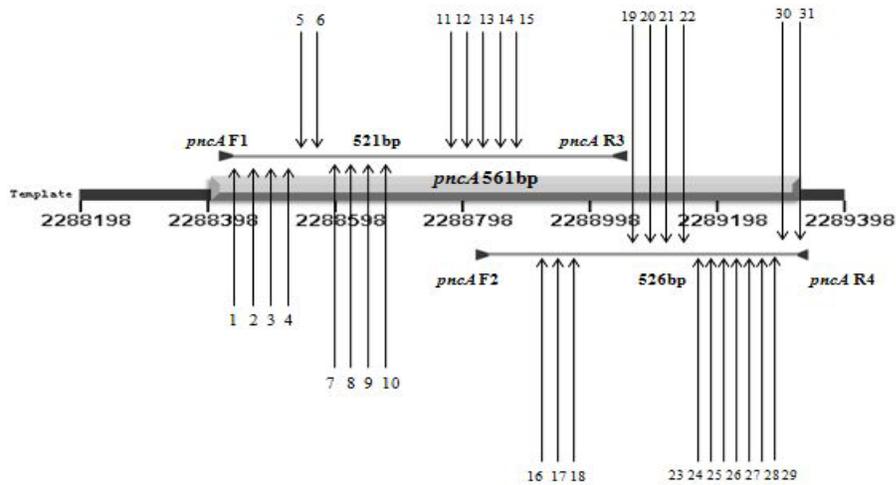
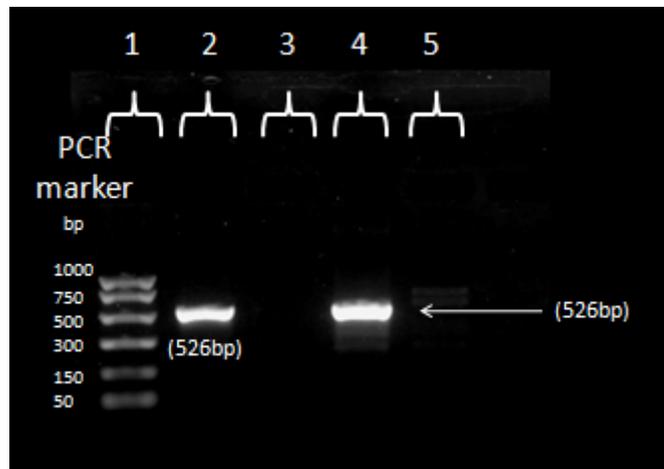


Figura 13. **Estructura genómica del gen *pncA***. La secuencia codificante está resaltada por la línea  y las coordenadas nucleotídicas en la parte inferior (de 2288198 a 2289398) corresponden a las establecidas para el genoma de *M. tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal , donde los oligonucleótidos (pncAF1, pncAR3, pncAF2 y pncAR4) están señalados por cabezas de flecha () y el tamaño del producto amplificado se muestra en pares de bases (bp). Las mutaciones y su ubicación han sido señaladas por las flechas verticales, donde la numeración corresponde a 1(Asp8) 2(Leu19Arg) 3(Leu27Pro) 4(Ile31Ser) 5(Leu35Pro) 6(A 140-141) 7(Val45Ala) 8(Ala46Ser) 9(Asp49) 10(His51) 11(Ser67Pro) 12(Trp68) 13(His71Asp) 14(Cys72Tyr) 15(Gly74Arg) 16(Lys96) 17(Gly97Ser) 18(Ser104Arg) 19(Gly122Ser) 20(Val125Phe) 21(G 411-412) 22(Glu27stop) 23(Ala134) 24(Thr135) 25(His137Gln) 26(Cys138) 27(Val139Gly) 28(Thr142Met) 29(Ala146Thr) 30(Thr174Ile) 31(GG 520-521)

A





## 6.8. Mutaciones en los Genes no Condicionan a un Fenotipo de Resistencia a Fármacos Antituberculosis de Primera Línea

Se encontró que en el 47% de las cepas evaluadas no tienen mutaciones que se asocien al fenotipo de resistencia y/o susceptibilidad a los fármacos de primera línea (Tabla 19).

## 6.9. Análisis de los Perfiles de Expresión Genética en Cepas Pansensible y Panresistente a Fármacos de Primera Línea

Con la finalidad de identificar nuevos genes que puedan proponerse como marcadores moleculares asociados a la sensibilidad o resistencia de fármacos de primera línea, se realizó el análisis de perfiles de expresión genética usando microarreglos genómicos de *M. tuberculosis*. Se obtuvo el RNA total proveniente de las cepas H37Rv y CIBIN99, con la pureza, concentración e integridad necesarias para los pasos de marcaje e hibridación en microarreglos (Figura 15), los cuales se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El esquema experimental se muestra en la Figura 16. Se llevó a cabo el análisis de los datos de microarreglos en el Departamento de Genómica Computacional del mismo INMEGEN, y de forma paralela con la colaboración del Licenciado en Biotecnología Genómica José Dávila Velderrain.

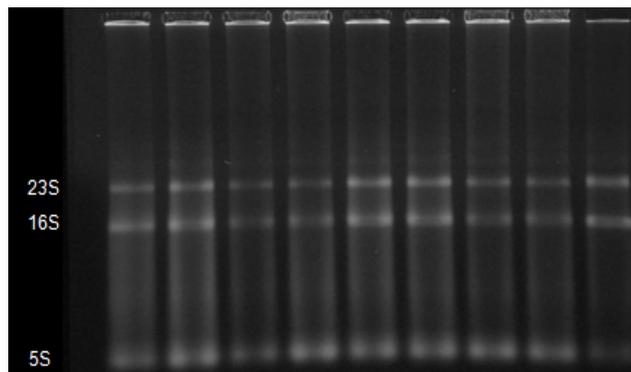


Figura 15. Imagen representativa del RNA total obtenido de *M. tuberculosis*. Se indican las subunidades ribosomales 5S, 16S y 23S.

Tabla 19

Mutaciones presentes en los genes *rpsL*, *rrs*, *katG*, *inhA* (promotor), *rpoB*, *embB* y *pncA* de las cepas de estudio y su relación con el fenotipo de resistencia a los fármacos de primera línea.

Grupo	ID Cepa	Mutaciones en genes vinculados a fármacorresistencia*							Fenotipo**				
		<i>rpsL</i>	<i>rrs</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i> (promotor)	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>pncA</i>	S	I	R	E	P
1	986			X					r	r	r	r	r
	1007						X	X					
	1025						X						
2	813		X		X				r	r	r	s	r
	852	X		X				X					
	918	X		X									
3	840				X				r	r	r	s	s
	929			X									
	1068	X											
4	804								r	r	s	s	s
	998			X									
	1003			X			X						
5	814								r	s	s	s	s
	903							X					
	1044												
6	803			X					s	r	r	s	r
	822			X			X						
	983			X			X	X					
7	867								s	r	s	s	s
	939												
	943												
8	806								s	s	s	s	s
	801												
	810							X					
Referencias	H37Rv								s	s	s	s	s
	CIBIN99	X		X			X		r	r	r	r	r

ID: identificación.

\*Las mutaciones encontradas están indicadas con el símbolo X, y las zonas en color negro corresponden a los datos no obtenidos.

\*\*SIREP: S, estreptomocina; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, pirazinamida. s, sensible; r, resistente.

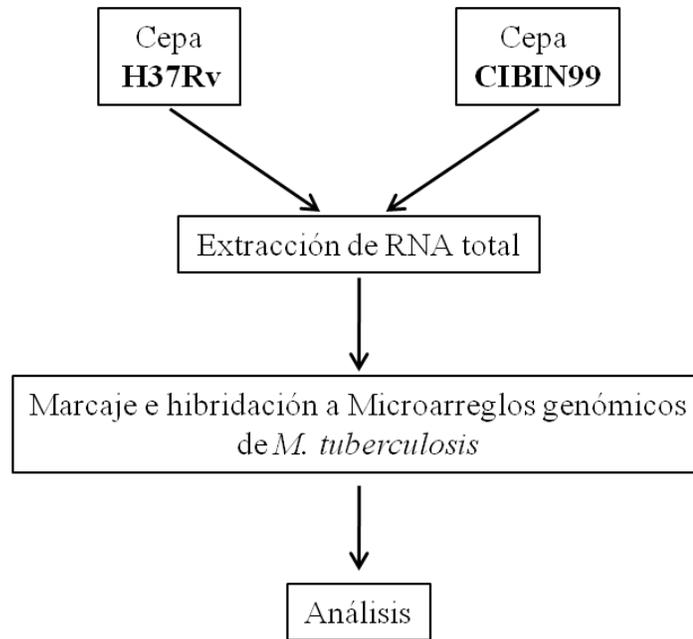


Figura 16. Esquema experimental para la evaluación de perfiles de expresión genética.

### 6.10. Análisis Exploratorio de Calidad de Datos

Se realizó un examen preliminar de los datos de los microarreglos para observar la calidad de los ensayos realizados. Se visualizó la intensidad de la señal emitida por cada microarreglo para descartar defectos espaciales en la manipulación durante la hibridación (Figura 18). En ninguna de las hibridaciones se observaron alteraciones en los microarreglos.

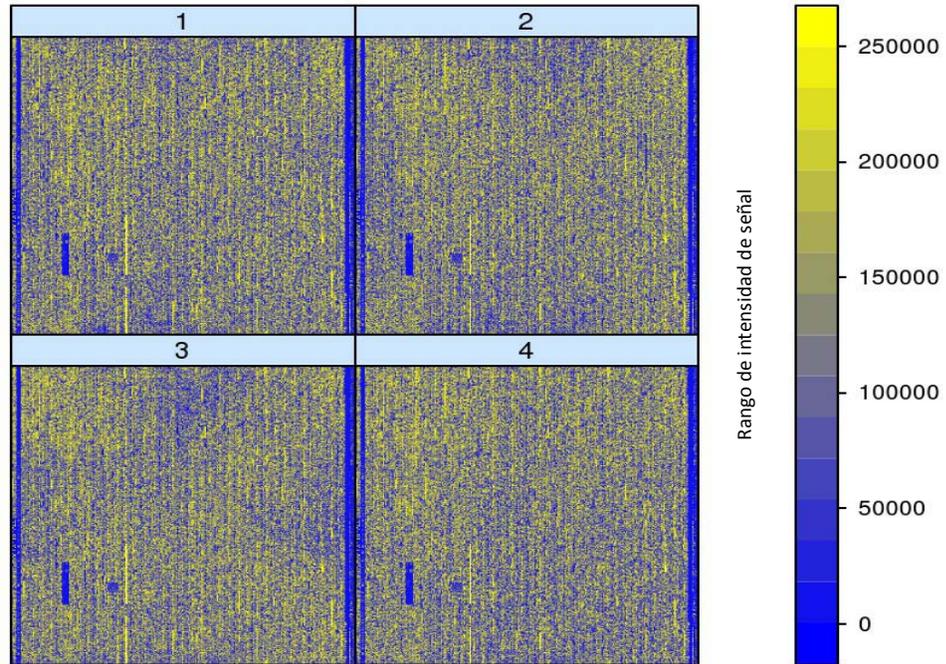


Figura 17. **Ejemplo de visualización de la intensidad de señal de los microarreglos.** Los paneles del 1 al 4 representan cada una de las imágenes individuales de los microarreglos, y el rango de intensidad de señal se muestra en el extremo derecho.

Además, para cada ensayo de microarreglos, se graficó la distribución de la intensidad de señal (Figura 18, panel A) y se comparó con los análisis estadísticos de los otros microarreglos (Figura 18, panel B), y de esta manera se corroboró la homogeneidad de los ensayos.

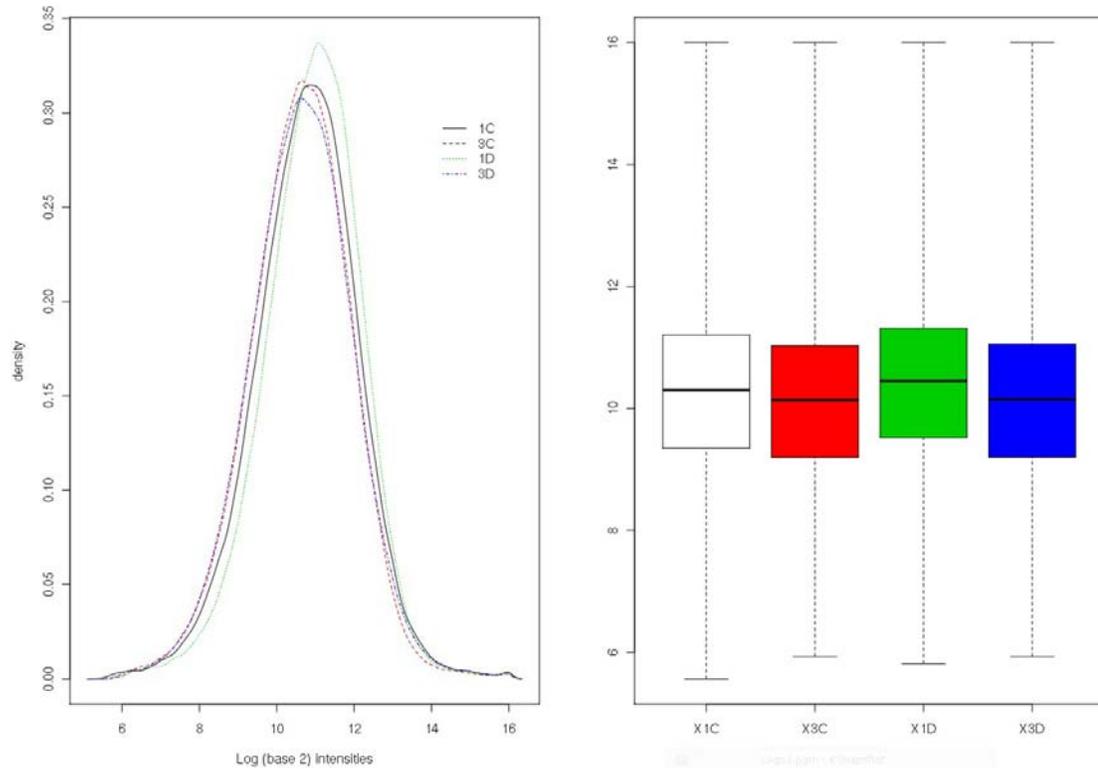


Figura 18. **Evaluación preliminar de la intensidad de señal de microarreglos.** Panel A, distribución de la intensidad de señal para cada uno de los microarreglos. Panel B, Comparativo de los análisis estadísticos de la intensidad de señal. 1C y 3C corresponden a datos obtenidos de la cepa H37Rv, 1D y 3D corresponden a datos obtenidos de la cepa CIBIN99.

Se visualizó la variabilidad de los datos obtenidos mediante la gráfica MvA, que permite hacer una comparación de la señal de los microarreglos mostrando el comportamiento de los datos respecto a una referencia, que en este caso, fue definida como la media de los datos totales de intensidad de señal. Se graficó la relación de cambio a lo largo de el rango de intensidades en escala logarítmica ( $\log_2$ ) (Figura 19).

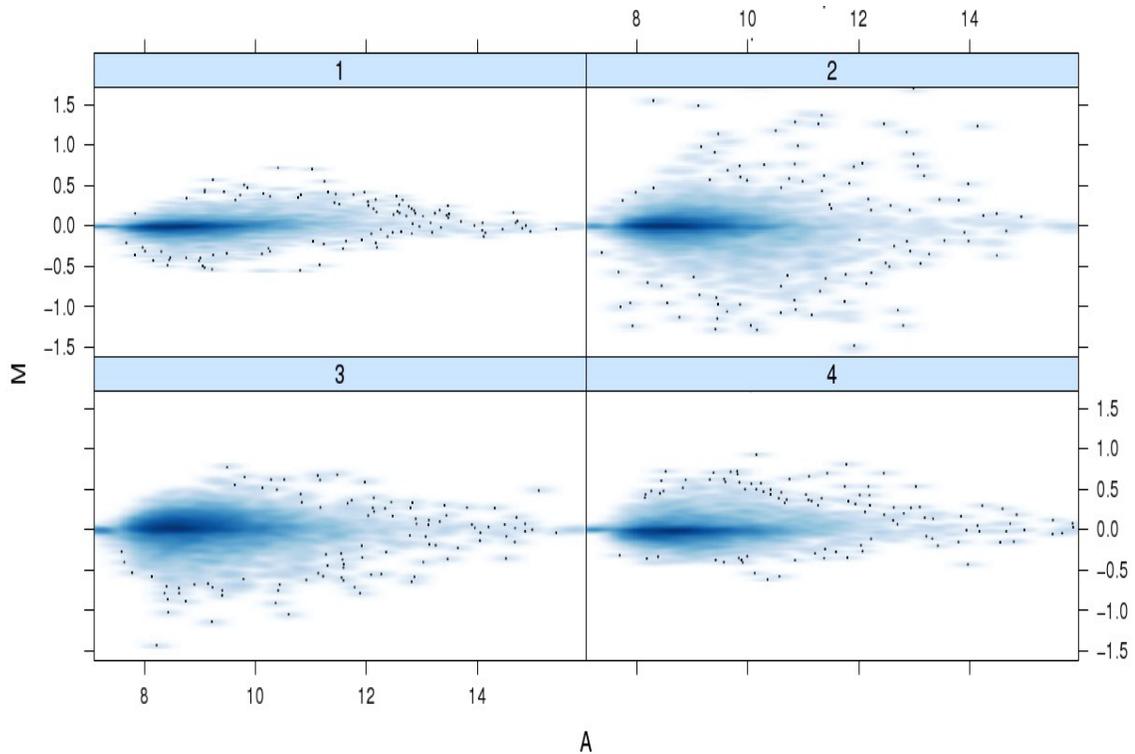


Figura. 19. **Gráficas MvA de los datos de microarreglos.** Se muestra la variabilidad de los datos de señal respecto a la referencia, donde  $M = \log_2$  (datos de microarreglos/datos de referencia) y  $A =$  media de todos los datos (referencia). Los números del 1 al 4 representan los datos arrojados por la intensidad de señal de cada uno de los microarreglos de las cepas H37Rv y CIBIN99 (los ensayos se realizaron por duplicado).

### 6.11. Preprocesamiento de Datos.

Se llevó a cabo el preprocesamiento de los datos mediante la aplicación del algoritmo MAS5, y el uso de *rma* (*robust microarray analysis*) que consta de:

a) Corrección de fondo (*background*), b) normalización, y c) cálculo sintetizado de la señal.

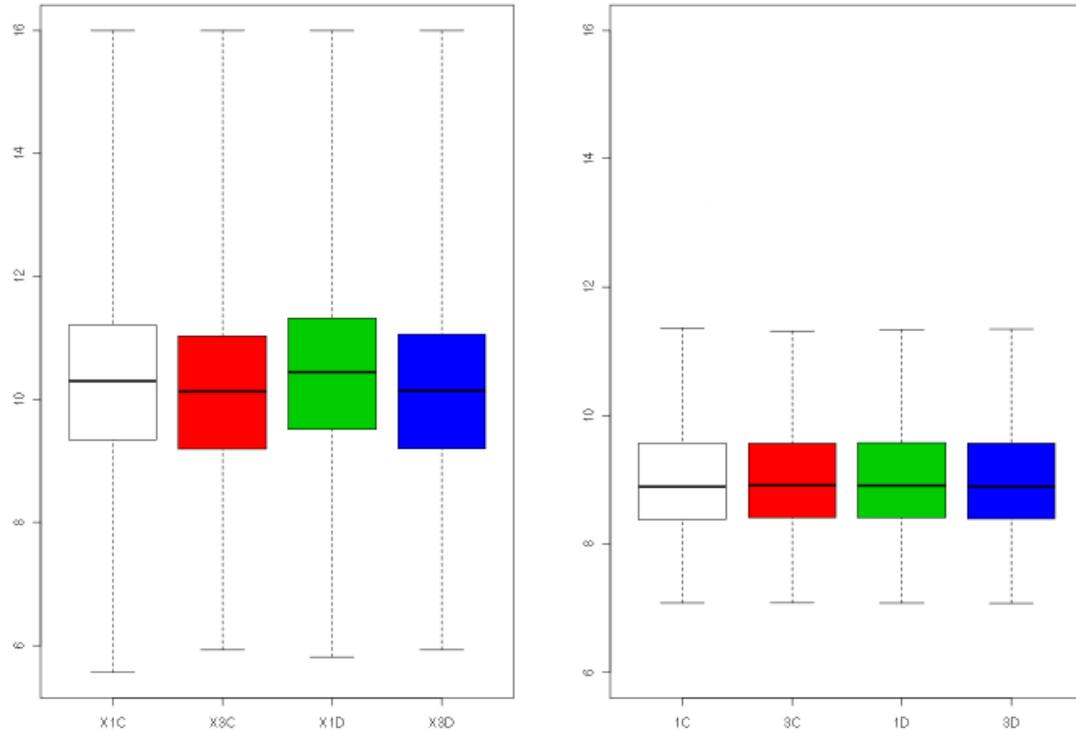


Figura 20. **Análisis comparativo de datos de muestras de microarreglos.** Ejemplos gráficos de estadísticos de los datos de los microarreglos antes del procesamiento (panel A) y después del procesamiento (panel B). 1C y 3C corresponden a datos obtenidos de la cepa H37Rv, 1D y 3D corresponden a datos obtenidos de la cepa CIBIN99.

Las diferencias entre posición y dispersión de los datos en los estadísticos de los datos arrojados por los microarreglos quedaron ajustadas después del pre-procesamiento (Figura 20).

### 6.12. Visualización de la Intensidad de Señal de los Microarreglos.

Se realizó un agrupamiento con base en la señal emitida por los microarreglos y se representó usando una gráfica de calor (Figura 21).

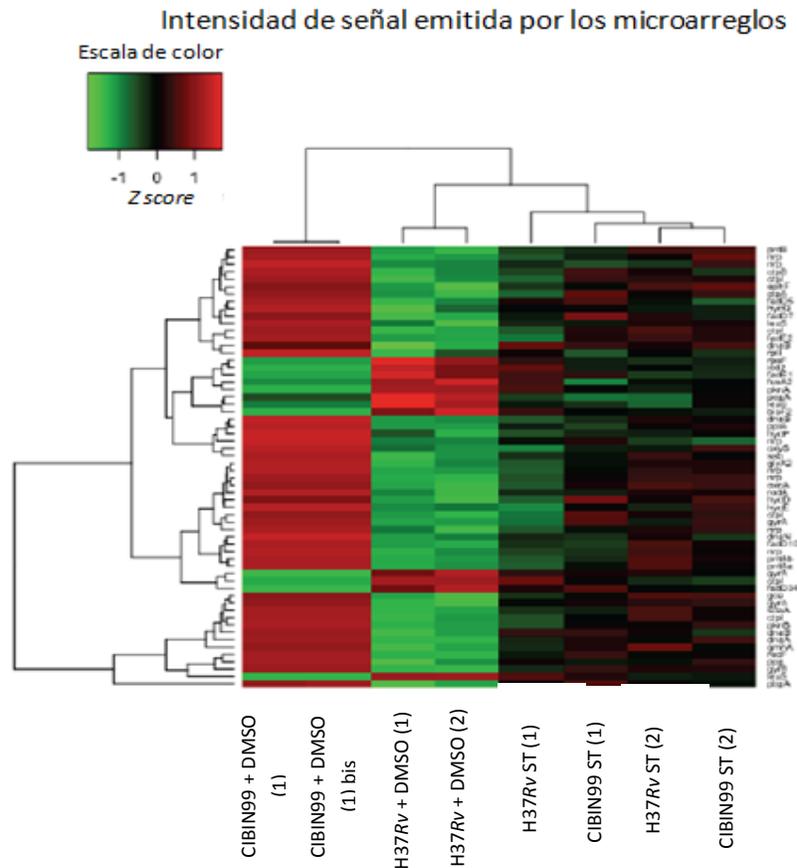


Figura 21. **Representación del agrupamiento de genes usando un mapa de calor y su comparación con los otros ensayos de microarreglos.** La escala de intensidad de la señal se muestra en la parte superior. El color rojo indica incremento en la expresión de genes, el color verde indica reducción en la expresión de genes. En la parte inferior del mapa se señalan las muestras \*ST (Sin tratamiento).

### 6.13. Expresión Diferencial de Genes Entre Cepas H37Rv y CIBIN99

Para el análisis de microarreglos se utilizó un  $\log-Fch \geq |0.5|$  y estadístico B ( $\log odds) > 0$ , lo que significa buscar una diferencia en los niveles de expresión de por lo menos una vez y con una certidumbre de al menos 50%, respectivamente, en los datos obtenidos para las cepas H37Rv y CIBIN99.

Sin embargo, usando estos parámetros no se encontró una diferencia significativa en la expresión de genes entre las cepas comparadas (Figura 22).

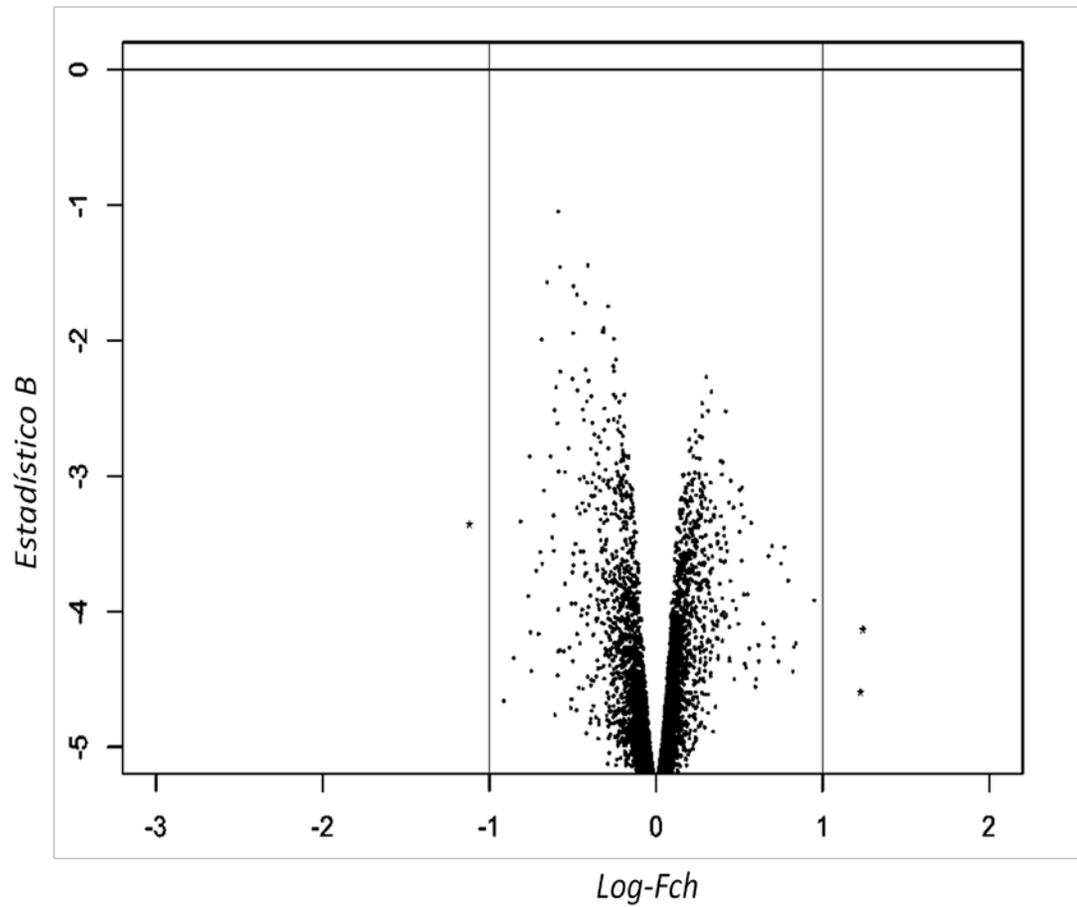


Figura 22. **Gráfica de volcán de los datos de microarreglos comparando la cepa H37Rv y CIBIN9.** Los datos de las cepas fueron analizados y comparados para identificar los genes diferencialmente modificados en su expresión usando el Log-Fch y estadístico B.

## 7. DISCUSIÓN

Uno de los principales problemas para controlar la enfermedad de TB es la frecuencia de cepas resistentes a fármacos, las cuales presentan mutaciones en una variedad de genes.

Estudios previos han relacionado la resistencia a estreptomicina con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs*. Las mutaciones en el gen *rpsL* han sido descritos como los de mayor relevancia en la resistencia a estreptomicina (Via *et al.*, 2010) y en nuestro estudio encontramos que el porcentaje de asociación de mutaciones con la resistencia fue de 18.75% en el codón 43 del gen *rpsL*. No se identificaron mutaciones en el codón 88 del mismo gen, el cual ha sido también asociado a la misma resistencia fenotípica. Chaoui *et al.* (2009) encontraron que de un grupo de cepas resistentes fenotípicamente a estreptomicina sólo el 12.1% y 1.7% presentaron mutaciones en el codón 43 y 88 del gen *rpsL*, respectivamente. En otro estudio, se encontró que el 54.54% de las cepas resistentes a estreptomicina presentaron la mutación en el codón 43, y un 9.09% en el codón 88 (Morris *et al.*, 1995). Además, Sekuguchi *et al.* (2007), encontraron que el 43.33% de cepas resistentes a estreptomicina tenían una mutación en el codón 43 del gen *rpsL*; inclusive se observó que todas las cepas presentaron una mutación silente en el codón 121. Spies *et al.* (2008) sugieren que el efecto de mutaciones múltiples pudiera deberse a una alteración en los genes que codifican para enzimas reparadoras de DNA. Otros polimorfismos para el gen *rpsL* (A363G y T51C) han sido reportados por Vía *et al.* (2010)

Referente al gen *rrs*, el cual codifica para la subunidad 16 ribosomal, que también se ha relacionado con la resistencia a estreptomicina, especialmente en las regiones 400 y 500 del gen (Brossier *et al.*, 2010; Chaoui *et al.*, 2009; Jugheli *et al.*, 2009; Via *et al.*, 2010), se encontró que el 16.25% de las cepas analizadas tienen una mutación en la posición A514T (Jugheli *et al.*, 2009; Post *et al.*, 2004; Via *et al.*, 2010). Aunque en este estudio no se encontraron otras mutaciones en esta región, se han reportado mutaciones en las posiciones 512 (Chaoui *et al.*, 2009), 513, 516 (Brossier *et*

*al.*, 2010; Sekiguchi *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 2008), 517 (Jugheli *et al.*, 2009), 426, 491 and 905 (Spies *et al.*, 2008) .

Estudios previos también han mencionado polimorfismos o mutaciones silentes en este gen (Jugheli *et al.*, 2009; Post *et al.*, 2004; Spies *et al.*, 2008; Via *et al.*, 2010). Además, mutaciones en las regiones 1300 y 1400, específicamente en las posiciones 1332, 1338, 1400, 1401 y 1539 del gen *rrs*, han sido vinculadas con la resistencia fenotípica a fármacos de segunda línea como los aminoglicósidos amikacina y kanamicina, por lo que estas mutaciones tienen un efecto sobre resistencia cruzada de las cepas resistentes de *M. tuberculosis* (Jugheli *et al.*, 2009; Sekiguchi *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 2008; Via *et al.*, 2010)

Todas las cepas de nuestro estudio, que presentan las mutaciones reportadas en los genes *rpsL* y *rrs*, son polirresistentes. El grupo de aislados que fenotípicamente solo tiene resistencia a estreptomycinina no presenta mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs*, como también lo ha reportado Chaoui *et al.* (2009), quienes describen que estas mutaciones se encuentran frecuentemente asociadas con las resistencias a isoniazida y rifampicina.

Los porcentajes de relación encontrados entre las mutaciones para los genes *rpsL* y *rrs* son altamente variables entre estudios previos, sin embargo, un alto porcentaje de las cepas que presentan resistencia a estreptomycinina no tienen un indicador genético bien descrito. Se han propuesto que varios mecanismos pueden estar vinculados de forma paralela con esta resistencia, como lo describe Spies *et al.* (2008) quienes encontraron que algunos aislados de *M. tuberculosis* presentan una resistencia baja a estreptomycinina sin presentar mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs*. Spies *et al.* (2008) proponen que los transportadores (bombas *efflux*) y las mutaciones en el gen *gidB* pueden ser responsables por la resistencia moderada a la estreptomycinina, y que podría generarse una actividad sinérgica entre estos mecanismos y los producidos por las mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs*.

Por otro lado, de las 19 cepas que se clasificaron como resistentes a isoniazida, el 68.41% tienen mutaciones en los genes *katG* e *inhA*. En el caso del gen *katG*, las mutaciones en la serina 315 causan cambios conformacionales en el canal de acceso del sustrato, provocando la incapacidad de la enzima (catalasa peroxidasa) de unirse al profármaco (isoniazida) para su activación (Cade *et al.*, 2010). En este estudio, el 57.89% de las cepas tienen la mutación en el codón 315, donde el aminoácido serina fue sustituido por los aminoácidos treonina y asparagina.

El porcentaje de mutaciones en el codón 315 de *katG* encontrado en este trabajo es muy similar al reportado en Marruecos (Chaoui *et al.*, 2009), donde se reportó que el 77.3% de aislados resistentes a isoniazida se podrían atribuir a mutaciones en el mismo codón y 68.6% a la sustitución Ser315Thr. La misma mutación fue reportada en mayor frecuencia por Hilleman *et al.* (2005) en Alemania, donde se encontró 88.4% de relación entre las mutaciones del codón 315 y la resistencia, de las cuales el 86.4% mostraron la mutación Ser315Thr y un 1.9% la mutación Ser315Asn. En Egipto, el 92.3% de los aislados resistentes presentaron la misma mutación (Abdelaal *et al.*, 2009); y en Lituania se mostró una relación del 85.7% (Bakonyte *et al.*, 2003). En Inglaterra se reportó que el 62.7% de las cepas resistentes a isoniazida tenían la mutación Ser315Thr (Baker *et al.*, 2005).

Otras mutaciones y polimorfismos han sido reportados para *katG* en diferentes posiciones del gen, aunque con menor relación porcentual a la resistencia a isoniazida (Baker *et al.*, 2005; Cade *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2004).

El promotor del gen *inhA* también ha sido vinculado a la resistencia de isoniazida por su inhibición a la enoil reductasa InhA de *M. tuberculosis*, formando un aducto covalente con el cofactor NAD (Rawat *et al.*, 2003). Respecto a las mutaciones en la región promotora del gen *inhA*, en este trabajo se encontró que el 10.52% de las cepas resistentes a isoniazida presentaron mutaciones en las posiciones -8 (T>G) y -15 (C>T). En Brasil, se encontró que el 25.8% de las cepas evaluadas estuvieron vinculadas con mutaciones en el promotor del mismo gen; algunas mutaciones fueron reportadas

también en el gen estructural de *inhA* en 6 de los aislados (Cardoso *et al.*, 2004). Porcentajes de asociación más bajo fueron reportados por Chaoui *et al.* (2009) quienes encontraron que el 3% de las cepas resistentes a isoniazida presentaban una mutación en la posición -15 del promotor de *inhA*. Baker *et al.* (2005) encontró que el 27.2% de los aislados resistentes a isoniazida tenían por lo menos una mutación en la región promotora del gen *inhA*.

En el presente trabajo no se encontraron mutaciones simultáneas en el promotor del gen *inhA* y el codón 315 de *katG* de una misma cepa, incluso se ha reportado una asociación negativa fuerte ( $p = 0.0088$ ) entre este tipo de mutaciones en aislados resistentes a isoniazida (Hazbon *et al.*, 2008). En dicho trabajo se sugiere que las dobles mutantes no son favorecidas en la evolución de la cepa. Sin embargo, existe un reporte experimental que contradice dicho postulado, pues se encontraron 4 de 202 aislados con la doble mutación (Baker *et al.*, 2005).

En este trabajo se encontró la mutación Met306Ile del gen *embB* en el 75% de los aislados resistentes a etambutol. La mutación Met306Ile ha sido asociada con la concentración mínima inhibitoria (MIC) de *M. tuberculosis* a etambutol de 20µg/ml, que se reporta ser significativamente más baja que la MIC encontrada en aquellas cepas que presentan una sustitución Met306Val o Met306Leu, la cual es de 40µg/ml (Ramaswamy and Musser, 1998). Parsons *et al.* (1997) encontraron un 95.5% de aislados con alta resistencia a etambutol, los cuales tenían alguna mutación en los codones 306 y 406, por lo que concluyeron que Met306 y Gly406 tienen un papel crítico en el sitio activo de la glicosil transferasa. Incluso, existen algunos trabajos que proponen a esta mutación como un indicador de resistencia a etambutol (Starks *et al.*, 2009), y se han desarrollado pruebas moleculares rápidas que actualmente están disponibles en el mercado. En India, se reportaron mutaciones previamente descritas para el gen *embB* y 10 nuevas localizadas en los codones 221, 225, 227, 271, 272, 281, 282, 287, 293 y 294 (Jain *et al.*, 2008).

De manera interesante, en el presente estudio se identificaron cepas con la mutación Met306Ile, sin embargo solo el 50% (3 aislados) presentaron resistencia a etambutol y el resto de ellas se clasificaron como susceptibles. Otros trabajos han reportado la presencia de mutaciones en el gen *embB* en cepas susceptibles al fármaco, en contraposición con los reportes que proponen las mutaciones en los codones 306 y 406 como marcadores de resistencia, por ejemplo, en Rusia se encontraron 48 (31.2%) de 154 aislados susceptibles a etambutol con las mutaciones en la secuencia del gen *embB* (Mokrousov *et al.*, 2002).

Por otro lado, en el trabajo de Brossier *et al.* (2010) utilizaron la prueba MRBDRsl para detectar resistencia a etambutol, y encontraron que 57% de aislados eran resistentes y 43% no presentaban mutaciones en el codón 306 del gen *embB*; estos datos son distintos a los encontrados en este trabajo donde el 13.63% (3/22) de las cepas sensibles tienen la mutación Met306Ile. Así mismo, en 2004, se identificaron 13 aislados de *M. tuberculosis* multifármacorresistente que eran susceptibles a etambutol en pacientes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana, y se encontró que las mutaciones estaban presentes en el 62% de los aislados (Post *et al.*, 2004).

Estos datos sugieren un mecanismo de susceptibilidad a etambutol diferente al blanco genético *embB* en *M. tuberculosis*, por lo que el gen *embB* no es un indicador ideal de resistencia (Brossier *et al.*, 2010; Mokrousov *et al.*, 2002; Post *et al.*, 2004). Por esta razón, se han identificado otros mecanismos involucrados en la resistencia a etambutol, como la co-resistencia reportada por varios autores, los cuales encontraron una alta asociación entre la resistencia a etambutol y otros fármacos de primera línea, particularmente isoniazida y rifampicina (Jain *et al.*, 2008). En un estudio de 1,020 aislados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos de diferentes poblaciones (Australia, Colombia, India, México, España, Nueva York y Texas E.U.) con diferentes perfiles de susceptibilidad se encontró que las mutaciones en *embB306* no podía estar asociado con un solo tipo de fármacorresistencia, pero si se encontró una fuerte relación entre estas mutaciones y la resistencia a cualquier fármaco de primera línea. Por lo tanto, se ha propuesto que a pesar de que mutaciones en *embB306* no causa resistencia a etambutol

*per se*, sí puede predisponer al desarrollo de algún tipo de farmacoresistencia en *M. tuberculosis* (Hazbon *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo concuerdan con esta hipótesis, ya que todas las cepas con el codón *embB306* mutado son resistentes, al menos, a un fármaco de primera línea; el 100% (6/6) de las cepas con mutación en el codón 306 del gen *embB* se clasificaron como resistentes a isoniazida.

La pirazinamida difunde de forma pasiva en *M. tuberculosis* y es convertida en ácido pirazinoico por la enzima pirazinamidasa. Debido a un sistema de transportadores deficiente, la pirazinamida se acumula en grandes cantidades en la célula, lo que provoca una disminución del pH a niveles por debajo del óptimo y probablemente inactiva alguna enzima vital como la sintasa de ácidos grasos I (Somoskovi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Por lo tanto, el mayor mecanismo de resistencia a pirazinamida es precisamente la pérdida de actividad de pirazinamidasa, codificada por el gen *pncA* (Cheng *et al.*, 2005)

El gen *pncA* también es altamente variable, con numerosas mutaciones y polimorfismos (Cheng *et al.*, 2005; Jonmalung *et al.*; Jureen *et al.*, 2008; McCammon *et al.*, 2005; Mphahlele *et al.*, 2008; Sheen *et al.*, 2009b; Zimic *et al.*). Un rango de 75 a 97% de asociación han sido reportados entre la resistencia a pirazinamida y mutaciones en *pncA* (Cheng *et al.*, 2005; Zimic *et al.*), los cuales son significativamente más altos de los reportados en este trabajo, donde solo se relacionó el 23% de las cepas con dicha mutación.

Al comparar la frecuencia de mutaciones en *pncA* encontradas a partir de cepas resistentes a pirazinamida en Perú (Escalante *et al.*, 1998) con 210 mutaciones reportadas hasta Diciembre de 2008, Zimic *et al.* (2010) realizaron un mapa para relacionar la secuencia aminoacídica de la pirazinamidasa de acuerdo a la localización de las sustituciones en cada uno de los 20 dominios de la estructura secundaria de la enzima. Las regiones de sitio activo comprendida aproximadamente por los dominios L2 (residuos 8 a 25) y L7 (residuos 132 a 139); y el sitio de coordinación de metales en el dominio L4 (residuos 49 a 89) descritas por Du *et al.* (2001) fueron tomadas en cuenta

para el estudio. Se encontró que las sustituciones aminoacídicas tanto en las poblaciones peruanas como en las reportadas hasta 2008, no estaban distribuidas uniformemente a lo largo de la secuencia de la proteína, sino que la frecuencia y variabilidad de las mutaciones se concentraban en las láminas  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , lo que compromete al sitio de coordinación de metales. De la misma manera, una alta concentración de mutaciones ocurren en las regiones  $\beta 1-\alpha 1$  y  $\beta 4-\alpha 3$ , lo que comprende el sitio activa de la proteína. Todo esto sugiere la existencia de regiones *hot-spot* en el gen *pncA* asociados con la resistencia a pirazinamida.

Existen otros mecanismos propuestos para la manifestación de resistencia a pirazinamida, los cuales involucran las mutaciones en la región promotora del gen y la posible participación de otras regiones genómicas no identificadas (Jonmalung *et al.*; Sheen *et al.*, 2009a).

### **7.1. Expresión Génica Diferencial en *M. tuberculosis***

En este trabajo, durante el análisis de expresión de la cepa H37Rv susceptible a los fármacos de primera línea y la cepa multifármacorresistente CIBIN99, no se observó una diferencia significativa en el perfil de expresión basal entre ambas cepas.

De manera contraria, estudios previos han reportado diferencias en la expresión génica incluso entre diferentes clonas de la cepa H37Rv, lo cual sugiere una alta variabilidad debido a poblaciones heterogéneas (Andreu and Gibert, 2008). Además, el análisis de expresión entre cepas de referencia H37Rv y H37Ra han mostrado una diferencia en la expresión del 15% de los genes relacionados con los antígenos de células T, los de las familias PE/PPE y aquellos involucrados con el metabolismo de lípidos ante las mismas condiciones de crecimiento y tratamiento (Gao *et al.*, 2005).

Por otro lado, al analizar los datos obtenidos de los microarreglos comparando las cepas H37Rv y CIBIN99 expuestas a dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1% durante 4 h, como parte de un estudio paralelo al desarrollo de esta tesis (ver Apéndice I) se

encontraron diferencias significativas en la expresión de genes entre ambas cepas. Este evento sugiere un fenómeno de respuesta diferencial entre las cepas ante un xenobiótico. Se ha reportado que el DMSO provee citoprotección contra especies oxígeno reactivas (Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2010), aunque también se ha reportado que posee un efecto inhibitorio de crecimiento a altas concentraciones (12.5%) tanto en la cepa H37Rv como CIBIN99 de *M. tuberculosis* (Molina *et al.*, 2004).

A partir de los resultados obtenidos con la expresión diferencial provocada por el DMSO, se utilizó la información publicada por (Cole *et al.*, 1998) acerca de la clasificación de genes de *M. tuberculosis*, y se concluyó que la cepa CIBIN99 tuvo un incremento mayor a dos veces en la expresión de 6 genes del sistema de metabolismo de moléculas pequeñas, 7 involucrados con el metabolismo de macromoléculas y 2 en el sistema de procesos celulares. De manera consistente, estos sistemas se han reportado modificados en su expresión ante la respuesta de otros xenobióticos (Fisher *et al.*, 2002).

Se ha documentado que el estrés provocado por una exposición a múltiples fármacos provoca cambios en la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas clave como lo son el metabolismo energético, la transcripción, traducción e inducción de la regulación de los genes de respuesta al estrés. En este trabajo, algunos de los genes sobreexpresados en la cepa CIBIN99 por efecto del DMSO están vinculados con la respuesta al estrés, ya que se inducen los genes de choque térmico, los codificantes para transportadores, así como los involucrados con el metabolismo de aminoácidos.

Los genes vinculados con transportadores tienen especial relevancia ya que se asocian a la resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* ante los antimicrobianos (Waddell *et al.*, 2004). De manera particular, se ha reportado la sobreexpresión de genes que codifican para probables transportadores en una cepa de *M. tuberculosis* multifármacorresistente, la cual fue expuesta previamente a rifampicina e isoniazida (Jiang *et al.*, 2008). En este trabajo, se encontró al gen *groES*, clasificado dentro de proteínas de transporte, con una sobreexpresión significativa en la cepa CIBIN99 con respecto a la cepa de referencia H37Rv. El análisis de microarreglos también arrojó datos de

expresión diferencial de regiones intergénicas, las cuales no tienen una anotación por no estar caracterizadas (Fu and Shinnick, 2007), y que podrían tratarse de genes no identificados con funciones específicas involucradas en el fenotipo de resistencia a fármacos de primera línea.

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 8.1. Conclusiones

- Las mutaciones en los genes *rrs* y *rpsL* están presentes en el 25% de las cepas resistentes a estreptomicina.
- Las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* están presentes en el 68% las cepas resistentes a isoniazida.
- Las mutaciones en el gen *embB* están presentes en el 75% de las cepas resistentes etambutol, pero también se encontraron mutaciones en cepas sensibles a éste mismo fármaco.
- Las mutaciones en el gen *pncA* están presentes en el 23% las cepas resistentes a pirazinamida. También se observaron cepas sensibles a pirazinamida con mutación en el gen *pncA*.
- La expresión de genes en las cepas H37Rv y CIBIN99 no presentó diferencias significativas bajo las condiciones de manejo y cultivo usadas en este trabajo. Sin embargo, cuando las cepas fueron sometidas a tratamiento con dimetilsulfóxido (ver Apéndice I) se observó una expresión diferencial entre las cepas mencionadas.

## 8.2. Recomendaciones

- Secuenciación de gen *rpoB* en cepas de estudio.
- Selección y validación de genes candidatos por PCR cuantitativa.
- Caracterización de las regiones intergénicas con perfiles de expresión alterados.
- Analizar la expresión de genes propuestos en aislados de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles fenotípicos de fármacorresistencia.
- Obtener clonas de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* para su caracterización génica y así eliminar la variabilidad intrínseca de la población heterogénea dentro de las cepas.
- Caracterizar a genes de expresión temprana en los aislados clínicos de *M. tuberculosis* sometidos a una exposición de fármacos de primera línea.

## APÉNDICE I.

### Análisis de los Perfiles de Expresión de Cepas de *M. tuberculosis* Expuestas a Dimetilsulfóxido,

Con la finalidad de proponer genes que por su expresión diferencial se pudiesen relacionar con la fármacorresistencia de *M. tuberculosis*, se realizó un análisis paralelo al desarrollo de esta tesis por la M. en C. Katia Peñuelas Urquides, donde se sometieron las cepas H37Rv y CIBIN99 a tratamiento con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 0.1% durante 4 horas, previo a la extracción de RNA, para analizar la expresión génica. El procedimiento se describe a continuación:

#### METODOLOGÍA

##### **Cultivo de Cepas**

1. La activación de las cepas seleccionadas se llevó a cabo en medio de cultivo Lowenstein-Jensen y se cultivaron en una incubadora Nuair® US airflow CO<sub>2</sub> water jacketed incubator a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por un periodo de 10 a 15 días, hasta la obtención de biomasa suficiente para ensayos posteriores.
2. La resiembra se llevó a cabo en medio de cultivo Middlebrook 7H9. Se tomó una porción de colonias de *M. tuberculosis* crecida en medio Lowenstein-Jensen, la cual se homogenizó en un tubo de ensayo de 13 × 10 mm conteniendo 2.5 ml de agua desionizada estéril y seis perlas de vidrio. El tubo se agitó en *vórtex* por 3 min, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 min, para reducir el riesgo de diseminar aerosoles. De la suspensión de micobacterias, con una jeringa estéril se inoculó un volumen de 0.15mL en un tubo de ensayo nuevo de 13 × 10 mm, conteniendo 3 mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 adicionado con 10% de OADC Middlebrook (suplemento que consiste en ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa). Se determinó la turbidez de la suspensión por medición en un nefelómetro Densimat de BioMérieux® M005230. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, por dos a tres semanas. Se realizó un pasaje de los cultivos a un volumen de 13mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9, en

tubos cónicos de 50 mL de capacidad, con un inóculo de 1.0 mL de cultivo , con una densidad de micobacterias equivalente en turbidez al estándar 1 de McFarland (1 unidad McFarland es equivalente a  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mL de *E. coli*) y se continuó la incubación en condiciones estándar con agitación constante, hasta alcanzar una concentración equivalente a los estándares de McFarland entre 2.5 y 4.5.

### **Extracción de RNA total de cepas H37Rv y CIBIN99 tratadas con Dimetilsulfóxido DMSO**

La extracción de RNA de las cepas de *M. tuberculosis* se llevó a cabo a partir de cultivos líquidos usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Previo a esto, las cepas H37Rv y CIBIN99 se sometieron a una exposición de DMSO [0.1%] por 4 horas.

1. Al cultivo de las cepas H37Rv y CIBIN99 se agregó 10 µl de DMSO, para una concentración final de 0.1%. Los cultivos se incubaron por 4 h para las condiciones de crecimiento descritas previamente.
2. Se colocaron 10 ml de cada cultivo en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron 20 min a 3,390 rpm en centrífuga CIEC® centra GP8R a 4 °C.
3. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla micobacteriana se resuspendió en 800 µl del reactivo TRIzol®. La suspensión fue transferida a microtubos de 1.5 ml y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los microtubos fueron agitados por inversión 3 veces, para un tiempo final de incubación de 20 min a temperatura ambiente.
4. La suspensión TRIzol-micobacterias fue transferida a tubos Fast Prep® (Qbiogene Inc), el cual contenía perlas de vidrio.
5. Los tubos se sometieron a tres ciclos de 20 s cada uno en el agitador Fast Prep ® a un nivel 6 de velocidad; después de cada ciclo, los tubos se colocaron en hielo por 2 min.
6. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 3 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml.

7. Al microtubo se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló por inversión por 10 s, y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente.
8. El microtubo se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C, y la fase acuosa se transfirió a un microtubo nuevo.
9. Al sobrenadante se añadieron 500  $\mu$ l de isopropanol, el tubo se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
10. La muestra se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C.
11. El sobrenadante se desechó y la pastilla de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol al 75%. El tubo se volvió a centrifugar a 7,500 g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó y la muestra de RNA total se resuspendió en 35  $\mu$ l de TE 1X estéril.
12. La concentración y pureza del RNA extraído fue determinada en un espectrofotómetro Nanodrop Thermo® a una absorbancia de 260 y 280 nm, y la integridad del RNA fue evaluada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml).

### **Análisis de Expresión Usando Microarreglos**

Las muestras de RNA total obtenidas por duplicado de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*, expuestas y no expuestas a DMSO, fueron enviadas al Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN) para su marcaje e hibridación en microarreglos de Affymetrix.

Los Genechips® de Affymetrix fueron diseñados tomando como base la secuencia genómica de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Los Genechips® contienen todos los marcos abiertos de lectura (3,924 ORFs), 738 regiones intergénicas, así como 20 sondas de apareamiento perfecto y 20 de apareamiento imperfecto como controles positivos y negativos, respectivamente.

Tanto el marcaje y la hibridación de cDNA en los microarreglos fueron realizados de acuerdo al protocolo establecido por Affymetrix. La lectura de los

Genechips® se llevó a cabo usando el software Microarray Analysis Suite 5.0 (MAS5, Affymetrix). El análisis de los datos fue realizado con el apoyo de 1) Dra. Claudia Rangel Escareño del departamento de genómica computacional del INMEGEN, y 2) del Licenciado en Biotecnología Genómica José Dávila Velderrain. La evaluación de la calidad de los datos fue realizada utilizando el programa ArrayQualityMetrics del paquete Bioconductor en la plataforma R.

## RESULTADOS

### **Expresión Diferencial de Genes Entre Cepas H37Rv y CIBIN99 Tratadas con Dimetilsulfóxido.**

Con base en el análisis del INMEGEN, se encontró expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) [0.1%] durante 4 horas. Los resultados fueron obtenidos utilizando el criterio de análisis  $\log-Fch > |0.5|$  y el estadístico  $B > 0$  (*log-odds*) (Figura 23, Tablas 20 y 21).

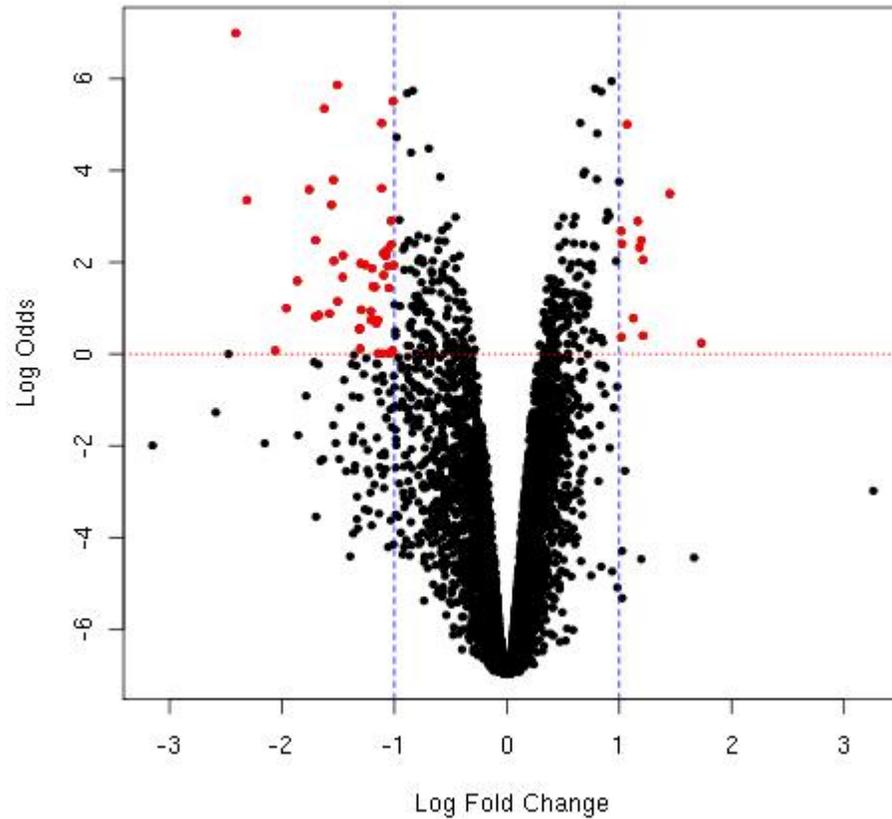


Figura 23. **Gráfica 1 de volcán del contraste de intensidad de señal de las cepas H37Rv y CIBIN99 con tratamiento.** En el cuadrante superior izquierdo están los genes sub-expresados y en el cuadrante superior derecho aquellos sobre-expresados.

Tabla 20

Regiones génicas alteradas en su expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO.

	Expresión diferencial alterada	Expresión disminuida	Expresión incrementada
Genes identificados (en la base de datos de NCBI)	60	54	6
Regiones intergénicas	162	87	75

Tabla 21

Genes alterados en sus perfiles de expresión de las cepas H37Rv respecto a CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO.

<b>Nombre del gen</b>	<b><i>log-FC</i></b>	<b>Valor <i>P</i></b>	<b>Estadístico <i>B</i></b>
<i>esxG</i>	-2.411	3.50E-07	6.994
<i>infA</i>	-1.508	1.62E-06	5.864
<i>esxJ</i>	-0.836	1.89E-06	5.739
<i>esxI</i>	-1.012	2.50E-06	5.508
<i>esxH</i>	-1.623	3.02E-06	5.350
<i>nrdH</i>	-0.981	6.20E-06	4.721
<i>rpsI</i>	-0.694	8.11E-06	4.478
<i>mmaA4</i>	-0.852	8.93E-06	4.390
<i>groES</i>	-1.542	1.69E-05	3.793
<i>whiB1</i>	-1.757	2.10E-05	3.583
<i>lppA</i>	-0.528	4.69E-05	2.793
<i>oppA</i>	-0.709	6.12E-05	2.524
<i>mkl</i>	-1.702	6.39E-05	2.480
<i>rpsK</i>	-0.605	6.49E-05	2.466
<i>fixA</i>	-0.906	7.19E-05	2.362
<i>thrA</i>	-1.098	8.46E-05	2.196
<i>fadD32</i>	-0.774	9.47E-05	2.079
<i>rplK</i>	-0.659	9.94E-05	2.030
<i>mce1F</i>	-0.744	0.00010456	1.978
<i>sseC2</i>	-1.301	0.00010478	1.976
<i>rpsJ</i>	-1.197	0.00011657	1.866
<i>efp</i>	-0.808	0.00012883	1.763
<i>rpmI</i>	-1.460	0.00014024	1.674
<i>tig</i>	-0.536	0.00014567	1.635
<i>ilvN</i>	-0.660	0.00015529	1.569
<i>echA11</i>	0.710	0.00016516	1.504
<i>rpsL</i>	-1.192	0.00017032	1.472
<i>glnD</i>	0.519	0.00020796	1.263
<i>ephF</i>	-0.523	0.00021953	1.207
<i>esxH</i>	-0.790	0.00024588	1.087
<i>tuf</i>	-0.950	0.00025653	1.043
<i>lprJ</i>	0.553	0.00026117	1.024
<i>polA</i>	0.512	0.00026982	0.990
<i>rpsP</i>	-0.813	0.00027568	0.967
<i>narG</i>	-1.296	0.00027649	0.964

Tabla 21 (continuación)

Genes alterados en sus perfiles de expresión de las cepas H37Rv respecto a CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO.

<b>Nombre del gen</b>	<b>logFC</b>	<b>Valor P</b>	<b>Estadístico B</b>
<i>mpt64</i>	-1.208	0.00028556	0.930
<i>lprA</i>	-0.723	0.00028959	0.915
<i>sigE</i>	-0.698	0.00029042	0.912
<i>pknD</i>	-0.797	0.00029081	0.910
<i>kdpD</i>	0.696	0.00030585	0.857
<i>ppiA</i>	-1.671	0.00030813	0.849
<i>lipF</i>	-1.702	0.00031983	0.810
<i>glnA1</i>	-1.187	0.00033797	0.751
<i>metK</i>	-0.692	0.00034931	0.717
<i>fadD2</i>	-1.160	0.00036534	0.669
<i>clpP2</i>	-0.865	0.00037795	0.633
<i>nusG</i>	-0.992	0.00042836	0.500
<i>glyA2</i>	-0.723	0.00044513	0.459
<i>rplP</i>	-0.704	0.00046535	0.412
<i>cysA2</i>	-0.990	0.00047033	0.400
<i>narG</i>	-0.747	0.0004895	0.358
<i>nrdI</i>	-0.672	0.00050671	0.321
<i>rpmJ</i>	-0.529	0.00053382	0.265
<i>yjcE</i>	0.539	0.00055512	0.224
<i>secY</i>	-0.536	0.00056586	0.203
<i>hupB</i>	-0.652	0.00057967	0.177
<i>cfp17</i>	-1.027	0.00065107	0.053
<i>sigK</i>	-0.807	0.00067332	0.017
<i>rpsA</i>	-1.040	0.00067688	0.012
<i>rplF</i>	-0.679	0.00067758	0.010

Con base en el análisis del Licenciado en Biotecnología Genómica José Dávila, se encontró una expresión diferencial en las cepas H37Rv y CIBIN99 tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) [0.1%] durante 4 horas. Los resultados fueron obtenidos utilizando el criterio de análisis  $\log-Fch > |1|$  y el estadístico  $B > 0$  (*log-odds*) (Figura 24 y Tablas 22 y 23).

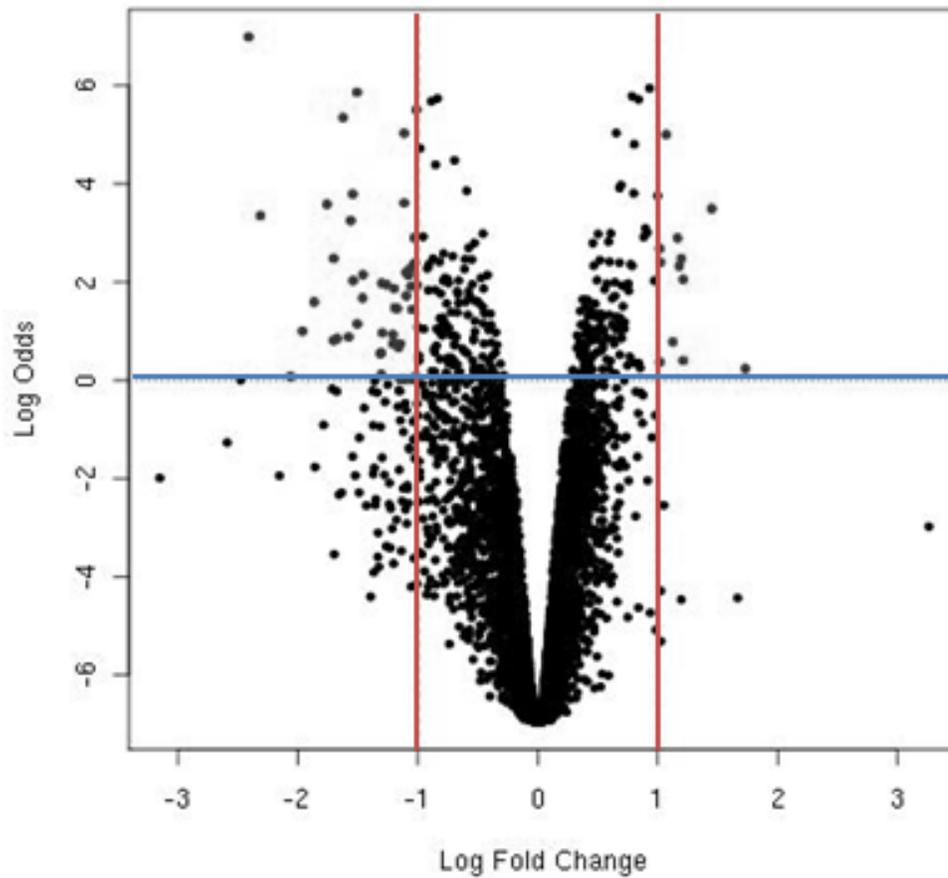


Figura 24. **Gráfica 2 de volcán del contraste de intensidad de señal de las cepas H37Rv y CIBIN99 con tratamiento.** En el cuadrante superior izquierdo están los genes sub-expresados y en el cuadrante superior derecho aquellos sobre-expresados en su perfil de expresión diferencial.

Tabla 22

Regiones génicas alteradas en su expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 sometidas a tratamiento con DMSO.

	Expresión diferencial alterada	Expresión disminuida	Expresión incrementada
Genes identificados (en la base de datos de NCBI)	20	20	0
Regiones intergénicas	42	30	12

Tabla 23

Selección de genes alterados en sus perfiles de expresión en las cepas H37Rv y CIBIN99, aplicando como criterio de selección  $\log_2FC > |1|$  y el estadístico B.

<b>Nombre del gen</b>	<b><i>logFC</i></b>	<b>Valor <i>P</i></b>	<b>Estadístico <i>B</i></b>
<i>esxG</i>	-2.411	3.50E-07	6.994
<i>infA</i>	-1.508	1.62E-06	5.864
<i>esxI</i>	-1.012	2.50E-06	5.508
<i>esxH</i>	-1.623	3.02E-06	5.350
<i>groES</i>	-1.542	1.69E-05	3.793
<i>whiB1</i>	-1.757	2.10E-05	3.583
<i>mkl</i>	-1.702	6.39E-05	2.480
<i>thrA</i>	-1.098	8.46E-05	2.196
<i>sseC2</i>	-1.301	0.00010478	1.976
<i>rpsJ</i>	-1.197	0.00011657	1.866
<i>rpmI</i>	-1.460	0.00014024	1.674
<i>rpsL</i>	-1.192	0.00017032	1.472
<i>narG</i>	-1.296	0.00027649	0.964
<i>mpt64</i>	-1.208	0.00028556	0.930
<i>lipF</i>	-1.702	0.00031983	0.810
<i>glnA1</i>	-1.187	0.00033797	0.751
<i>fadD2</i>	-1.160	0.00036534	0.669
<i>rpsA</i>	-1.040	0.00067688	0.012

Al contrastar los resultados de los microarreglos de la cepa H37Rv, sensible a los fármacos de primera línea y tratada con DMSO, contra los resultados arrojados por los microarreglos de la cepa CIBIN99, multifármacorresistente tratada con DMSO, se encontró que 20 genes están disminuidos en su expresión al menos dos veces, con una probabilidad mayor al 50%.

## LITERATURA CITADA

- Abdelaal A, El-Ghaffar HA, Zaghloul MH, El Mashad N, Badran E and Fathy A. 2009. Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing: a randomized trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 8:4.
- Andreu N and Gibert I. 2008. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis (Edinb).* 88:553-559.
- Augustynowicz-Kopec E, Jagielski T, Kozinska M, Zabost A, Klatt M and Zwolska Z. 2008. Molecular analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clin Microbiol Infect.* 14:605-607.
- Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD and Drobniewski FA. 2005. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1455-1464.
- Bakonyte D, Baranauskaite A, Cicenaitė J, Sosnovskaja A and Stakenas P. 2003. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2009-2011.
- Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ and Inamine JM. 1996. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11919-11924.
- Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V and Sougakoff W. 2010. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 48:1683-1689.
- Bulut Y, Yenisehirli G, Otlu B, Seyfikli Z, Çelikel S, Yilmaz A and İnonu H. 2009. Primary Drug Resistance and Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in the Kelkit Valley. *Turk J Med Sci.* 39 101-107.
- Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzsky KF, Salas-Castillo SP and Ghiladi RA. 2010. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci.* 19:458-474.
- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama Mde L, Mamizuka EM, Hirata RD and Hirata MH. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3373-3381.
- CDC. 2006. Revised definition of extensively drug-resistance tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep.* 11:1176.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S and Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.

Coll P. 2003. [Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21:299-307; quiz 308, 326.

Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, Akrim M, Victor TC and El Mzibri M. 2009. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Infect Dev Ctries*. 3:278-284.

Cheng VC, Yew WW and Yuen KY. 2005. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 24:711-720.

De La Iglesia AI and Morbidoni HR. 2006. [Mechanisms of action of and resistance to rifampicin and isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*: new information on old friends]. *Rev Argent Microbiol*. 38:97-109.

Dos Vultos T, Mestre O, Rauzier J, Golec M, Rastogi N, Rasolofo V, Tonjum T, Sola C, Matic I and Gicquel B. 2008. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 3:e1538.

Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H and Kim SH. 2001. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*. 40:14166-14172.

Endoh T, Yagihashi A, Uehara N, Kobayashi D, Tsuji N, Nakamura M, Hayashi S, Fujii N and Watanabe N. 2002. Pyrazinamide resistance associated with *pncA* gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Epidemiol Infect*. 128:337-342.

Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, Soini H, Pan X, Valiente-Castillo O and Musser JM. 1998. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis*. 79:111-118.

Escribano I, Rodriguez JC, Llorca B, Garcia-Pachon E, Ruiz M and Royo G. 2007. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy*. 53:397-401.

Fisher MA, Plikaytis BB and Shinnick TM. 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol*. 184:4025-4032.

Fu LM and Shinnick TM. 2007. Genome-wide analysis of intergenic regions of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using Affymetrix GeneChips. *EURASIP J Bioinform Syst Biol*. 23054.

Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, Yan W, Holmes S and Small PM. 2005. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Microbiology*. 151:5-14.

Hazbon MH, Motiwala AS, Cavatore M, Brimacombe M, Whittam TS and Alland D. 2008. Convergent evolutionary analysis identifies significant mutations in drug resistance targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3369-3376.

Hillemann D, Kubica T, Rusch-Gerdes S and Niemann S. 2005. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:1229-1231.

Jain A and Dixit P. 2008. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci.* 33:605-616.

Jain A, Mondal R, Srivastava S, Prasad R, Singh K and Ahuja RC. 2008. Novel mutations in emb B gene of ethambutol resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: a preliminary report. *Indian J Med Res.* 128:634-639.

Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X and Wang H. 2008. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist.* 14:7-11.

Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M and Chaiprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol.* 10:223.

Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F and Rigouts L. 2009. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:5064-5068.

Jureen P, Werngren J, Toro JC and Hoffner S. 2008. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1852-1854.

Kuczynska-Wisnik D, Matuszewska E, Furmanek-Blaszk B, Leszczynska D, Grudowska A, Szczepaniak P and Laskowska E. 2010. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling. *Res Microbiol.* 161:847-853.

Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE and Andersson DI. 2004. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1289-1294.

McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas, II, Graviss EA, Vijg J and Quitugua TN. 2005. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2210-2217.

Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T and Vyshnevskiy B. 2002. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. *J Clin Microbiol.* 40:1617-1620.

Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M and Rouse D. 1995. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 171:954-960.

- Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsaker T, Muthivhi T, Weyer K, Fourie PB and Grewal HM. 2008. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 46:3459-3464.
- Negi SS, Singh U, Gupta S, Khare S, Rai A and Lal S. 2009. Characterization of RPO B gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis. *Indian J Med Microbiol.* 27:226-230.
- Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW and Salfinger M. 1997. Drug resistance in tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am.* 11:905-928.
- Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN and Kaplan G. 2004. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis.* 190:99-106.
- Ramaswamy S and Musser JM. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 79:3-29.
- Rawat R, Whitty A and Tonge PJ. 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13881-13886.
- Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC and Aznar J. 2004. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42:1585-1589.
- Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T and Kirikae T. 2007. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 45:179-192.
- Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Lopez-Llano J, Fuentes P, Valencia E and Zimic MJ. 2009a. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 89:109-113.
- Sheen P, Mendez M, Gilman RH, Pena L, Caviedes L, Zimic MJ, Zhang Y, Moore DA and Evans CA. 2009b. Sputum PCR-single-strand conformational polymorphism test for same-day detection of pyrazinamide resistance in tuberculosis patients. *J Clin Microbiol.* 47:2937-2943.
- Somoskovi A, Parsons LM and Salfinger M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* 2:164-168.
- Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML and Zaha A. 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2947-2949.
- Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM and Posey JE. 2009. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1061-1066.

van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM and van Embden JD. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 31:1987-1995.

Via LE, Cho SN, Hwang S, Bang H, Park SK, Kang HS, Jeon D, Min SY, Oh T, Kim Y, Kim YM, Rajan V, Wong SY, Shamputa IC, Carroll M, Goldfeder L, Lee SA, Holland SM, Eum S, Lee H and Barry CE, 3rd. 2010. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean Patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 48:402-411.

Waddell SJ, Stabler RA, Laing K, Kremer L, Reynolds RC and Besra GS. 2004. The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis (Edinb).* 84:263-274.

WHO. (2007) Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/print.html>.

WHO. 2009. tuberculosis control: a short update to the 2009 report. WHO/HTM/TB/2009.426.

WHO. 2010. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3.

Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z and Dziadek J. 2009. Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. *BMC Microbiol.* 9:10.

Zager EM and McNerney R. 2008. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 8:10.

Zaki ME-S and Goda T. 2006. Study of phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both Isoniazid and Ethambutol. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology.* 14 377-388.

Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H and Sun Z. 2003. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 52:790-795.

Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A and Gilman RH. 2010. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infect Genet Evol.* 10:346-349.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Laura Adiene González Escalante

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología

Tesis: **IDENTIFICACIÓN DE GENES VINCULADOS CON LA CONDICIÓN DE RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium tuberculosis*.**

Campo de Estudio: Microbiología.

Datos Personales: Nacida en Monclova Coahuila el 12 de Mayo de 1985.  
Hija de Ing. José Alfredo González Garza y Lic. Martha Eneida Escalante García.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2007 como Químico Bacteriólogo Parasitólogo.